VERGLEICHENDE GC– UND HPLC–BESTIMMUNG ÄTHERISCHER ÖLE IN GEMISCHEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dietrich Friess
aus Schwäbisch Hall

1978

78 399

VERGLEICHENDE GC– UND HPLC–BESTIMMUNG ÄTHERISCHER ÖLE IN GEMISCHEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dietrich Friess
aus Schwäbisch Hall

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 1978

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff

Die vorliegende Arbeit wurde im März 1973 am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Mai 1978 abgeschlossen.
Sie stand unter der Leitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar, danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes, Tübingen, Herrn Prof. Dr. H. Auterhoff, danke ich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und Vertrauen.

Den Firmen

Dragoco, 3450 Holzminden, und
Haarmann & Reimer GmbH, 3450 Holzminden,

danke ich für die großzügige Bereitstellung von teilweise schwer zu beschaffenden Terpen-Vergleichssubstanzen.

Herrn Sigloch (Pharmazeutisches Institut, Tübingen) danke ich für die freundliche und fachkundige Durchführung zahlreicher Arbeiten, die sich bei Reparaturen, Änderungen oder auch bei der Neukonstruktion von Geräteteilen ergaben.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ZUSAMMENSTELLUNG DER IN MELISSEN-, MENTHA-, PINUS- UND EUCALYPTUSÖL ZU ERWARTENDEN INHALTSSTOFFE UND CHARAKTERISIERUNG DER ÖLE MIT PHYSIKALISCHEN UND PHYS.-CHEMISCHEN METHODEN	6
2.1	Zu erwartende Inhaltsstoffe	6
2.2	Physikalische und phys.-chem. Untersuchungen (Dichte, Brechungsindex, UV, IR)	18
3.	GASCHROMATOGRAPHIE	24
3.1	Wahl der chromatographischen Bedingungen	25
3.1.1	Stationäre Phase	26
3.1.2	Trägermaterial	28
3.1.3	Imprägnierungsgrad	29
3.1.4	Trennstufenzahl	29
3.1.5	Trägergas(-geschwindigkeit)	30
3.1.6	Temperatur(-programm)	31
3.2	Trennungen der vier ätherischen Öle	31
3.3	Faktoren, die die quantitative GC-Analyse beeinflussen	36
3.3.1	Probenvorbereitung	36
3.3.2	Art und Genauigkeit der Probendosierung	38
3.3.3	Stoffveränderung vor oder auf der Säule und die Faktoren, die diese beeinflussen (Probenverdampfung, Probenkonzentration, Säulenwandmaterial, Säulentemperatur, Säulenlänge) und Tests der Säulen auf Stoffveränderungen	40
3.3.4	Linearität von Detektor und Registriereinrichtung	48
3.3.5	Das zum Ausmessen der Peakflächen gewählte Verfahren	48
3.3.6	Umwandlung der Meßwerte in das Analysenergebnis	49
	a) 100-%-Methode	50
	b) Zumisch-Methode	50
	c) interner Standard	51
	d) absolute Eichung	51
3.4	Quantitative GC-Bestimmungen verschiedener Inhaltsstoffe im Einzelöl und im Gemisch der Öle	51
3.4.1	Bestimmung des Geraniols im Melissenöl (mit verschiedenen Auswerte-Methoden)	53
3.4.2	Bestimmung des Melissenöls im Gemisch der Öle	63
3.4.3	Bestimmung des Menthols im Menthaöl	68
3.4.4	Bestimmung des Menthaöls im Gemisch der Öle	70
3.4.5	Bestimmung des Cineols im Eucalyptusöl	73
3.4.6	Bestimmung des Eucalyptusöls im Gemisch der Öle	75
3.4.7	Gleichzeitige Bestimmung aller vier Öle im Gemisch	77

		Seite
3.5	Diskussion der GC-Untersuchungen	80
4.	FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	84
4.1	Vergleich zwischen GC und LC	84
4.2	Dünnschichtchromatographie	86
4.2.1	Vergleich DC - HPLC	86
4.2.2	Ziel der DC-Untersuchungen	88
4.2.3	Wahl der chromatographischen Bedingungen	88
4.2.3.1	Sorbenzien und Fm der Literatur	88
4.2.3.2	Für die DC-Arbeiten verwendete chromatographische Systeme - Kammerform und zu erwartende Eigenschaften der Fm	90
4.2.4	Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe	93
4.2.4.1	R_f-Werte der Vergleichsstoffe in den 3 Einkomponenten-Fm	93
4.2.4.2	Diskussion der Selektivität der Einkomponenten-Fm und der Möglichkeiten der HPLC-Bestimmung einzelner Komponenten	97
4.2.4.3	Einfluß des dem Fm zugesetzten Anteils an Kohlenwasserstoffen auf die relative Retention	100
4.2.4.4	Einfluß des Wassergehalts der stationären Phase auf die relative Retention	101
4.2.5	Trennungen der ätherischen Öle	105
4.2.5.1	Identifizierung von Inhaltsstoffen	106
4.2.5.2	UV-Remissions-Orts-Kurven	110
4.2.5.3	Fluoreszierende Inhaltsstoffe	110
4.2.5.4	Zur Identität des Menthaöls	111
4.2.6	Zur quantitativen Beurteilung der DCs ätherischer Öle	112
4.2.7	Diskussion der DC-Untersuchungen	115
4.3	Hochdruckflüssigchromatographie	116
4.3.1	Vergleich mit anderen LC-Methoden	116
4.3.2	Säulenchromatographie auf unpolarer stationärer Phase	119
4.3.2.1	Beschreibung des chromatographischen Systems	119
4.3.2.2	Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe	124
4.3.2.3	Trennungen der 4 ätherischen Öle und Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung	126
	a) bei UV-Detektion	131
	b) bei RI-Detektion	135
4.3.2.4	Diskussion der HPLC-RP-Untersuchungen	138
4.3.3	Säulenchromatographie auf polarer stationärer Phase	139
4.3.3.1	Eigenschaften der stationären Phase	139
4.3.3.2	Eigenschaften der mobilen Phasen	141
4.3.3.3	Entwicklung der säulenchromatographischen Trennung der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen	143
	a) DC-Vorversuche	144
	b) Vorversuche auf trocken gefüllten Säulen geringer Trennleistung	146
	c) Übertragung der Vorversuche auf HPLC-Trägermaterialien	150

Seite

4.3.3.4 Dünnschichtteilchen oder durch-und-durch poröse Teilchen 152
4.3.3.5 Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe auf Kieselgel mit dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser 154
4.3.3.6 Trennungen der ätherischen Öle und Möglichkeiten quantitativer Bestimmungen 158
a) bei UV-Detektion 162
b) bei RI-Detektion 164
4.3.3.7 Erfahrungen mit dem Fm Petroläther-Methanol auf Kieselgel 165
4.3.3.8 Chromatographisches Verhalten der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen auf aktiviertem Kieselgel 174
4.3.3.9 Diskussion der HPLC-Untersuchungen auf Kieselgel 176
4.3.4 Faktoren, die die quantitative LC-Analyse beeinflussen 178
4.3.4.1 Probenvorbereitung (Proben-Lm, -Konzentration und -Volumen) 179
4.3.4.2 Art und Genauigkeit der Probendosierung 181
4.3.4.3 Eigenschaften der für quantitative Bestimmungen verwendeten Fm 188
4.3.4.4 Genauigkeiten der Durchflußrate, der Fm-Zusammensetzung, der relativen Wassersättigung, der Temperaturen des Fm-Vorrats, der Pumpen, der Raumluft und der Säule 189
4.3.4.5 Stoffveränderungen 196
4.3.4.6 Beladbarkeit des chromatographischen Systems und linearer Bereich der Detektoren 196
4.3.4.7 Weitere Fehler, die bei der Detektion entstehen können 202
4.3.4.8 Auswertung der Peakhöhen oder Peakflächen 210
4.3.4.9 Umwandlung der Meßwerte in das Analysenergebnis 212
4.3.5 Quantitative HPLC-Bestimmungen 213
4.3.5.1 Bestimmungen der ätherischen Öle im Gemisch anhand der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen mittels UV-Detektion 213
4.3.5.2 Bestimmung von Cineol im Eucalyptusöl mittels RI-Detektion 222
4.3.6 Diskussion der HPLC-Untersuchungen 226

5. SCHLUSSDISKUSSION - VERGLEICH DER GC- UND HPLC-ERGEBNISSE 229

6. ZUSAMMENFASSUNG 239

7. ALLGEMEINER EXPERIMENTELLER TEIL 241

7.1 Elektronen-Spektroskopie 241

7.2 IR-Spektroskopie 241

7.3 Gaschromatographie: apparative Ausrüstung - Probendosierung - Integration - verwendete GC-Säulen Herstellen, Konditionieren und Beurteilen der Säulen - Belastbarkeit der Säulen - Lebensdauer der Säulen - Messung der Retentionszeiten 241

Seite

7.4 Dünnschichtchromatographie: Kammersysteme - verwendete Kieselgelplatten - Fm - Laufstrecken und Entwicklungszeiten - Auftragen der Proben, Probenmenge und Proben-Lm - Beladbarkeit der Schicht - Detektion - Richtigkeit der R_f-Werte - Quantitative Untersuchungen - UV-Remissionsmessung 245

7.5 Hochdruckflüssigchromatographie: apparative Ausrüstung - Fm-Vorbereitung - Fm-Förderung - Probendosierung - Gebrauch der Detektoren - Integration Säulenfüllmaterialien, Säulenwandmaterial, Füllen, Test und Lebensdauer der Säulen - zur Richtigkeit der k'-Werte - zu 4.3.3.8 - zu 4.3.4.6 254

7.6 Verwendete Öle, synthetisierte oder bei den quantitativen Bestimmungen verwendete Vergleichssubstanzen und Reinigung der Lösemittel 274

8. LITERATURVERZEICHNIS 281

9. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN, SYMBOLE UND DEFINITIONEN EINIGER CHROMATOGRAPHISCHER BEGRIFFE 288

1. EINLEITUNG

Die meisten ätherischen Öle[1-8] sind komplexe Stoffgemische, in denen Monoterpen- und Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe, deren verschieden stark zyklisierte und oxidierte Derivate (offenkettig, mono-, bi- und trizyklisch; Alkohole, Aldehyde, Ketone, Äther), sowie Aromaten (meist Phenole und aromatische Ester) enthalten sind.

Aufgrund der ähnlichen und sehr zahlreichen Inhaltsstoffe (über 100 in einem ätherischen Öl sind keine Seltenheit) konnten viele Verbindungen erst in den letzten Jahrzehnten mit der Entwicklung neuer physikalisch-chemischer Trennverfahren (DC, GC, LC) und neuer physikalischer Methoden (IR, NMR, MS) abgetrennt und aufgeklärt werden. Bis dahin war man bei der Charakterisierung ätherischer Öle meist auf die - bezüglich der Einzelkomponenten wenig aussagekräftigen - älteren physikalischen Methoden (u.a. Siedepunkt, Dichte, Brechungsindex, Viskosität), auf organoleptische Prüfungen (Geruch, Geschmack) oder auf chemische Gruppenanalyse angewiesen, wie die Bestimmung von Alkoholen, Phenolen, Carbonylverbindungen, Estern oder ungesättigten Verbindungen.

Chemische Bestimmung einzelner Komponenten im Gesamtöl sind nur für wenige Inhaltsstoffe möglich, meist wenig spezifisch, zeitraubend und nur für vergleichsweise große Substanzmengen anwendbar. Die Reaktionsbedingungen, die bei der chemischen Analyse angewandt werden, sind für manche Stoffe zu aggressiv, so daß Stoffveränderungen stattfinden, wie Dehydratisierungen oder Zyklisierungen. Beispielsweise wird Citronellal bei der Bestimmung der freien Alkohole in Isopulegol umgewandelt und als Isopulegylacetat miterfaßt[9].

Es war daher seit jeher ein Anliegen der Analytik ätherischer Öle bessere Trennmethoden zu finden. Dieses Verlangen wurde durch die Entwicklung neuer chromatographischer Methoden in den letzten 2 bis 3 Jahrzehnten (DC, GC) zumindest für analytische

und halbpräparative Stoffmengen zum großen Teil befriedigt. Die zuerst entwickelte DC zeichnete sich durch eine bis dahin nicht gekannte Schnelligkeit bei guter Trennschärfe aus. Sie erwies sich für die Trennung von ätherischen Ölen als geeignet. Die ersten Analysen mit dieser Methode waren Trennungen von ätherischen Ölen[10,11]. Durch die einige Jahre später entwickelte GC fand die DC nicht die Verbreitung in der Terpenchemie, wie bei der Analyse schwer flüchtiger oder polarer Stoffe, z.B. viele Arzneimittel[12]. Die GC liefert neben einer besseren qualitativen Auftrennung vor allem quantitativ besser auswertbare Ergebnisse. Weitere Vorzüge der GC - besonders für die Routineanalytik - sind: geringer Zeit- und Arbeitsaufwand, gute Wiederholbarkeit der Analysen, geringer Substanzbedarf und die Möglichkeit der Automation.

So machte es die GC in einem bis dahin nicht gekanntem Maße möglich, Aussagen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung, über Verfälschungen und eventuell auch Alter und Herkunft eines ätherischen Öles zu machen. Auch gegenüber den chemischen Einzelbestimmungen erwies sich die GC meist als spezifischer und genauer. So gibt beispielsweise das Essential Oil Subcommittee[13] bei der Cineol-Bestimmung in ätherischen Ölen der GC den Vorzug vor den älteren Methoden (wie Gefrierpunktserniedrigung, Komplexbildung mit o-Kresol, 1-Naphthol, Resorcin, Phosphorsäure, IR, Photometrie nach der Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd), obwohl es gelegentlich schwierig ist, eine vollständige Trennung des Cineols und der ähnlich flüchtigen Monoterpen-Kohlenwasserstoffe zu erreichen.

Eingeschränkt wird die quantitative Aussage chromatographischer Methoden, wenn es nicht gelingt, vollständig aufgelöste Peaks zu erhalten. Bei Vielkomponentengemischen, wie bei ätherischen Ölen und erst recht bei den zu untersuchenden Ölgemischen, ist eine vollständige Trennung auf gepackten GC-Säulen nur für wenige Komponenten zu erreichen. Für die nur teilweise getrennten Stoffe ist je nach dem Grad der Überlappung ein mehr oder weniger großer Fehler für die quantitative Bestimmung zu erwarten.

Zum Teil sehr schlechte Ergebnisse liefert die GC bei Verbindungen, die leicht verändert werden, sei es durch die erhöhte Temperatur oder durch Katalyse an den aktiven Oberflächen des Trägermaterials oder an den Innenwänden des GC-Systems. Häufig zitierte Beispiele für Veränderungen während der GC sind: ungesättigte Kohlenwasserstoffe, wie Pinen[14], Limonen[15], Terpenepoxide[16], Aldehyde wie Citral[17], oder Terpenalkohole, besonders tertiäre wie Linalool[18]. 50 proz. Verluste oder gar völlige Umwandlung einer Komponente sind aus der GC der ätherischen Öle bekannt[17,18].

Zwar ist es möglich, diese Fehler, wenn sie erkannt werden, durch inaktive Oberflächen und niedere Arbeitstemperaturen klein zu halten oder zu vermindern, doch sind in vermehrtem Maße Kontrollen des GC-Systems erforderlich.

Gegenüber der GC kann die Flüssigchromatographie (DC, LC, HPLC) auf erhöhte Trenntemperaturen verzichten, doch auch bei Raumtemperatur sind bei Sorbentien mit so großen Oberflächen, wie sie in der Flüssigchromatographie verwendet werden, Stoffveränderungen beobachtet worden[19-27]. Diese wurden meist zurückgeführt auf am Trägermaterial haftende Säure-, Basen- oder Metallspuren, oder auf Reste von oxidierenden Stoffen am Träger oder im Fließmittel. Allerdings stammen die in der Literatur zitierten Beispiele aus der weniger schonenden DC oder wurden bei Säulentrennungen mit Sorbentien höherer Aktivität oder bei langen Verweilzeiten der Probe in der Säule gefunden. Es ist zu erwarten, daß sich Stoffveränderungen in der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)[28-44] vermeiden lassen, sofern nicht mit Sorbentien hoher Aktivität oder bei erhöhter Temperatur gearbeitet wird.

Bezüglich der Trennstärke und der Analysengeschwindigkeit ist die in den letzten Jahren entwickelte HPLC der GC vergleichbar, wenn nicht überlegen, und somit für Routineuntersuchungen gut geeignet. Unterschiede zur GC bestehen in den Mechanismen, die den Trennungen zugrunde liegen, und in den Möglichkeiten der Detektion. Die in der GC häufig verwendeten und für

die ätherischen Öle geeigneten Detektoren, Flammenionisationsdetektor (FID) und Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD), zeigen die verschiedenen Terpen-Inhaltsstoffe etwa gleich empfindlich an. Demgegenüber sind die für die HPLC zur Verfügung stehenden Detektoren, wenn empfindlich, in ihrer Anzeige sehr selektiv (z.B. UV- oder Fluoreszenz-Detektor) oder wenig empfindlich, wie der Brechungsindexdetektor (RI), welcher bezüglich seiner Selektivität häufig mit dem WLD der GC verglichen wird.

Selektive Detektoren zeigen einen Teil der Stoffe nur teilweise oder gar nicht an; dadurch wird die Zahl der Komponenten scheinbar verringert. Diese Eigenschaft wird bei der quantitativen Analyse oft ausgenutzt, wenn es nicht oder nur schwer gelingt, eine vollständige Trennung zu erhalten. Es ist zu erwarten, daß sich diese Möglichkeit auch bei den zu untersuchenden Vielkomponentengemischen anwenden läßt.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit etwa des UV-Detektors für einzelne Probesubstanzen ist weiter damit zu rechnen, daß einige Stoffe, auch wenn sie in sehr geringer Menge vorliegen, gut quantitativ zu bestimmen sind. Dies ist von Interesse, da viele der geruchlich hervortretenden Inhaltsstoffe häufig nur in geringen Mengen vorliegen, jedoch für den Wert des Produktes mitentscheidend sind, z.B. Citral im Citronenöl[45].

Ein weiterer Vorzug der Flüssigchromatographie gegenüber der GC ist, daß nicht nur die stationäre Phase, sondern auch die mobile Phase verändert werden kann. Dadurch wird eine vielfach größere Auswahl an chromatographischen Milieus mit unterschiedlichster Selektivität geboten. - Das jeweils selektivste zu finden ist jedoch noch weitgehend eine Sache des Zufalls und besonders bei einer Vielzahl von ähnlichen Stoffen sehr zeitraubend.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, inwieweit sich die HPLC für die quantitative Bestimmung ätherischer Öle eignet. Dabei sollen die LC-Ergebnisse den GC-Ergebnissen vergleichend gegenübergestellt werden. Zum Kennenlernen der chromatographischen Systeme und zur Identifizierung der Substanzen findet auch die DC Anwendung. Besonders interessiert, inwieweit sich einzelne ätherische Öle in daraus hergestellten Ölgemischen oder Arzneizubereitungen anhand charakteristischer Inhaltsstoffe bestimmen lassen. Für die Untersuchungen werden die folgenden in der Pharmazie häufig verwendeten ätherischen Öle herangezogen: Melissenöl, Pfefferminzöl, Fichtennadelöl und Eucalyptusöl.

2. ZUSAMMENSTELLUNG DER IN MELISSENÖL, MENTHAÖL, PINUSÖL UND EUCALYPTUSÖL ZU ERWARTENDEN INHALTSSTOFFE UND CHARAKTERISIERUNG DER ÖLE MIT PHYSIKALISCHEN UND PHYS.-CHEMISCHEN METHODEN

2.1 Zu erwartende Inhaltsstoffe

Tab. 2-1 gibt einige Inhaltsstoffe der 4 ätherischen Öle sowie deren Eigenschaften wieder, die für die LC-Detektion oder für die GC interessant sind. Das für die Tabelle hauptsächlich verwendete Nachschlagewerk von Gildemeister und Hoffmann[1)] berücksichtigt aufgrund seiner Erscheinungsjahre (1956 - 1968) nur wenig die mit der Verbreitung und Vervollkommung der GC gerade auf diesem Gebiet verbundenen Fortschritte. Zum Teil fehlen überhaupt - besonders bei wirtschaftlich wenig interessierenden Ölen - gründliche und neuere Untersuchungen.

Weiter handelt es sich bei den aus der Literatur zitierten Inhaltsstoffen um Verbindungen, die aus schonend behandelten Ölen mit definierter botanischer Herkunft isoliert wurden, während die für die eigenen Untersuchungen verwendeten Handelsöle Produkte mit unbekannter Vorgeschichte sind, d.h., es ist mit Substanzen zu rechnen, die während der Lagerung entstanden sind oder mit solchen, die nicht in jenen botanischen Arten vorkommen, aus denen das Öl gewonnen sein sollte. So wurden in die Tabelle auch die Inhaltsstoffe von Citronenöl und Citronellöl aufgenommen, da Melissenöle des Handels fast stets Gemische aus diesen beiden Ölen darstellen[46)]. In die Tabelle wurden z.T. auch Komponenten mitaufgenommen, die nur in geringen Mengen in den ätherischen Ölen gefunden wurden. Soweit diese genügend große ε-Werte aufweisen, können sie bei UV-Detektion leicht zu Komponenten mit den größten Peakflächen werden, besonders wenn die Hauptinhaltsstoffe der Öle nicht oder nur wenig UV absorbieren.

Die einzelnen Inhaltsstoffe wurden in der Tabelle nach Stoffklassen geordnet; dies geschah vor allem mit Rücksicht auf die Chromatographie, da besonders für die polaren stationären Pha-

sen ein Zusammenhang zwischen Retentionsverhalten und funktionellen Gruppen besteht.

Eine Aufzählung der Verbindungen nach ihrem Vorkommen in den einzelnen Ölen wurde nicht vorgenommen. Dadurch wären Wiederholungen notwendig gewesen, weil viele Stoffe, besonders die ontogenetisch einfachen Terpenkohlenwasserstoffe, in mehr als einem der behandelten Öle vorkommen. Das Vorhandensein der Inhaltsstoffe in einem der Öle wurde durch Symbole gekennzeichnet; Stoffe, die zu mehr als 10 % in einem der Öle vorkommen können, wurden durch Unterstreichen des betreffenden Symbols hervorgehoben.

C: Citronenöl von Citrus medica L. ssp. limonum
(Lit. 1, Bd. V, 516ff. (1959)

Cm: Java-Citronellöl von Cymbobogon winterianus Jowitt
(Lit. 1, Bd. IV, 388ff. (1956) und Hagers Handbuch,
4. Ausg., Bd. 4, S.409f., Springer-Verlag, Berlin 1973)

E: Eucalyptusöl von Eucalyptus globulus Arten
(Lit. 1, Bd. VI, 202 (1961) und Bd. I, 267 (1956))

M: Amerikanisches Pfefferminzöl von Mentha piperita Arten
(Lit. 1, Bd. VII, 297 (1961) und Lit. 7)

Ml: Melissenöl mit
a) französicher Herkunft (Lit. 1, Bd. VII, 155 (1961))
b) deutscher Herkunft (Lit. 27)

P: Schwedisches Fichtennadelöl von Pinus silvestris L.
(Lit. 1, Bd. IV, 205 (1956))

Zu den UV-Daten in Tab. 2-1[1,47,48] sei erwähnt: Häufig stimmen bei mehreren in der Literatur zitierten Werten diese über ein zulässiges Maß hinaus nicht überein. So liegen für Citral die ε-Werte in Äthanol zwischen 14000 und 40000 bei λ_{max}-Werten zwischen 237 und 239 nm. Weit größere Schwankungen beobachtet man für die Maxima unterhalb 215 nm, sowohl bezüglich der Maxima als auch der molaren Extinktion. Es ist zu vermuten, daß "künstliche Maxima"[49] als Stoffkonstanten angenommen wurden. Abhängig von der UV-Qualität des Lösemittels, dem Streulichtanteil, der Konzentration und der Schichtdicke können diese Werte erheblich schwanken. "Künstliche Maxima" lassen sich von echten Maxima durch ihre konzentrationsabhängigen Maxima und ε-Werte (nicht Lambert-Beer-linear) unterscheiden.

Tabelle 2-1: Zu erwartende Inhaltsstoffe in Citrusöl, Citronellöl, Eucalyptusöl, Pfefferminzöl, Melissenöl und Pinusöl

Substanz	Vorkommen in	λ_{max},	ε_{max},	Lm[a]	n_D^{20}-Wert[b]	Sdp.(°C)[c]
Kohlenwasserstoffe:						
Monoterpen-KW:						
cis-α-Ocimen (1)	Ml				1,4865	177
trans-β-Ocimen (2)	Ml					
(-)-Limonen (3)	Cm M					
(+)-Limonen (4)	C Cm P				1,4706	176
α-Terpinen (5)	M	265	6450	KW	1,477	181
γ-Terpinen (6)	C	250	5	KW	1,4765(14,5)	183
α-Phellandren (7)	M P	263	3300	Ät	1,4724	174
β-Phellandren (8)	C M P	232	9100	KW	1,4788	171
α-Pinen (9)	C E M P	210	2300	Ät	1,4658	156
β-Pinen (10)	C E P	208	5250	Ät	1,4765	162
Camphen (11)	C Cm M				1,4564(50)	158
Sabinen (12)	M				1,4674(17)	164
Δ-3-Caren (13)	P				1,4728	165
Sesquiterpen-KW:						
β-Caryophyllen (14)	M Ml	264	142	Ät	1,5004	257
Cadinen (15)	C Cm M P				1,5079	274
α-Cubeben (16)	Ml					
Copaen (17)	Ml				1,4894	250
β-Bourbonen (18)	Ml					
Bisabolen (19)	C				1,4901	261
Aromadendren (20)	C				1,4982	121(10)
aromatische KW:						
p-Cymol (21)	C M	273	500	KW	1,4904	177
Äther:						
Cineol (22)	E M				1,4575	174
Menthofuran (23)	M	220	6750	Ät	1,4807	196

a) Lösemittel: Ät = Äthanol, KW = gesättigter Kohlenwasserstoff

b) Temperatur in Klammern, wenn diese von 20° C abweicht

c) Dampfdruck in Klammern (in Torr), wenn abweichend von 760 Torr; Z = Zersetzungspunkt

Fortsetzung Tabelle 2-1:

Substanz	Vorkommen in	λ_{max},	ε_{max},	Lm[a]	n_D^{20}-Wert[b]	Sdp (°C)[c]
Ester:						
Geranylacetat (24)	C					
Geranylbutyrat (25)	Cm					
Citronellyl-acetat (26)	Cm					
Citronellyl-butyrat (27)	Cm					
Citronellyl-citronellat (28)	Cm					
Linalylacetat (29)	C				1,4401	220(Z)
Menthylacetat (30)	M				1,4472	227
Menthyliso-valerat (31)					1,4481	261
Bornylacetat (32)	P					
Myrtenylacetat (33)	E				1,4700	110(12)
trans-Pinocarvyl-acetat (34)	E				1,4772	227
Aldehyde und Ketone:						
Acetaldehyd (35)	M	290	17	KW	1,3392(18)	20
Aceton (36)	M	279	15	KW	1,3616	56,2
n-Butyraldehyd (37)	E				1,3843	75
n-Valeraldehyd (38)	E				1,3882	103
iso-Valeral-dehyd (39)	Cm M				1,3902	92
Capronaldehyd (40)	E				1,4039	128
3-Methylcyclo-hexanon-1 (41)	M				1,4478	169
n-Octylaldehyd (42)	C				1,4217	172
2-Methylhepten-2-on-6 (43)	C	278	52	Ät	1,4433	173
n-Nonylaldehyd (44)	C				1,4272	187
p-Isopropylcyclo-hexanon (45)	P					
n-Decylaldehyd (46)	C				1,4287	208
d-Citronellal (47)	C Cm Ml	235	85	Ät	1,4467	207

Fortsetzung Tabelle 2-1:

Substanz	Vorkommen in	λ_{max},	ε_{max},	Lm[a]	n_D^{20}-Wert[b]	Sdp.(°C)[c]
Aldehyde und Ketone:						
Citral a (Geranial) (48)	C Cm Ml	238,5	15050	Ät[d]	1,4902	228(Z)
Citral b (Neral) (49)	C Cm Ml	237,5	14380	Ät[d]	1,4868	228(Z)
3-Isopropyliden-1-acetylcyclopenten-5 (50)	E				1,4947	225
(-)-Menthon (51)	M	287	24	Ät	1,4504	210
(+)-Menthon (52)	M					
(-)-Isomenthon (53)	M				1,4536	209
(+)-Piperiton (54)	M	235	17500	Ät	1,4848	234
(+)-Pulegon (55)	M Ml	244	8000	KW	1,4880	224
(+)-Dihydrocuminaldehyd (56)	Cm E				1,5080	235
(-)-Carvon (57)	E	227	14500	Ät	1,4988	231
Myrtenal (58)	E	247	8900	Ät	1,5030	223
(-)-Pinocarvon (59)	E	241	5240	Ät	1,4942	223
(+)-Verbenon (60)	E	253	6840	Ät	1,4956	228
Jasmon (61)	M				1,4979(23)	258
Laurinaldehyd (62)	C				1,4328(25)	100°(3,5) =n-Dodecan
aromatische Aldehyde:						
Cuminaldehyd (63)	P					232
Anisaldehyd (64)	P	280	20000	Ät	1,5731	247
Alkohole:						
Amylalkohol (65)	E M				1,4136(12,6)	99
iso-Amylalkohol (66)	E M				1,4053	132
n-Octanol-3 (67)	M				1,4209	173
n-Octen-3-ol-1 (68)	Ml					
(+)-Citronellol (69)	C Cm Ml	236	55	Ät	1,4572	224
Linalool (70)	C Cm Ml	234	38	Ät	1,4624	199

d) F. Porsch, H. Farnow, Dragoco Report 1959, 248 (Das UV-Lösemittel ist nicht angegeben, doch ist aufgrund des Wellenlängenmaximums ein Alkohol zu vermuten)

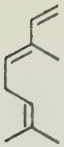
Fortsetzung Tabelle 2-1:

Substanz	Vorkommen in	λ_{max},	ε_{max},	Lm[a]	n_D^{20}-Wert[b]	Sdp.(°C)[c]
Alkohole:						
Geraniol (71)	C Cm Ml	238	195	Ät	1,4777	230
Nerol (72)	C	237	195	Ät	1,4670	226
(-)-Menthol (73)	M				1,4609	216
(+)-Neomenthol (74)	M				1,4603	212
α-Terpineol (75)	C E				1,4813	220
Sybinenhydrat (76)	M				1,4430(60)	196
(+)-Borneol (77)	E					214
(-)-Borneol (78)	Cm P					
Myrtenol (79)	E				1,4959	222
(-)-trans-Pinocarveol (80)	E				1,5005	210
Verbenol (81)	E					
Farnesol (82)	Cm					
Elemol (83)	Cm				1,5042(15)	144(15)
Cymbopol (84)	Cm				1,495 (30)	292
α-Cadinol (85)	Cm					
β-Butelenol (86)	M				1,5132	158(20)
Caryophyllen-alkohol (87)	M					288
Clovandiol (88)	M					
Globulol (89)	E					283
Phenole und Phenoläther:						
Thymol (90)	M	278	2500	Ät	1,5227	233
Carvacrol (91)	M	278	1800	Ät	1,5234	236
Eugenol (92)	Cm				1,5405(25)	253
Methyleugenol (93)	Cm				1,5341	249
Vanillin (94)	Cm	309 279 232	10700 10700 16200	Ät		285

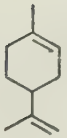
Fortsetzung Tabelle 2-1:

Substanz	Vorkommen in	λ_{max}, ε_{max}, Lm[a]	n_D^{20}-Wert[b]	Sdp.(°C)[c]
Carbonsäuren:				
Essigsäure (95)	C M		1,3744(15)	119
n-Valersäure (96)	M		1,4099(15)	186
Caprylsäure (97)	C		1,4278	239 (=n-C_8)
Caprinsäure (98)	C		1,4245(50)	269 (=n-C_{10})
Citronellsäure (99)	Cm		1,4537	139(10)
Laurinsäure (100)	C		1,4316(45)	(n=C_{12})

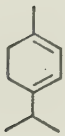
1



2



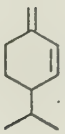
3



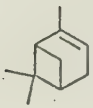
5

6

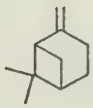
7



8



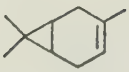
9



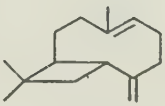
10

11

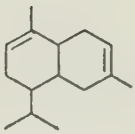
12



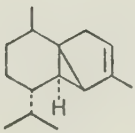
13



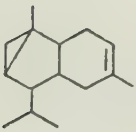
14



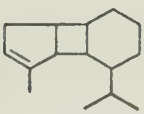
15



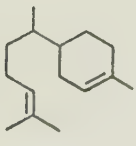
16



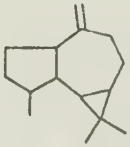
17



18

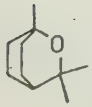


19

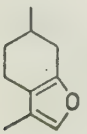


20

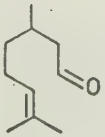
21



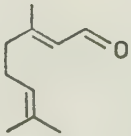
22



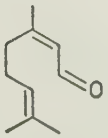
23



47

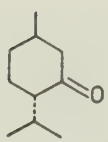


48

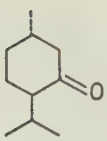


49

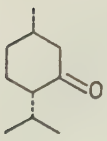
Abb. 2-1: Strukturformeln zu Tab. 2-1



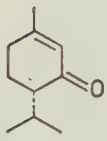
51



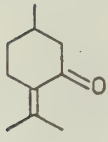
52



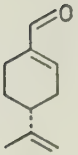
53



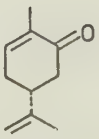
54



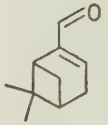
55



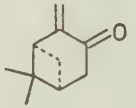
56



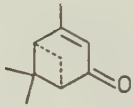
57



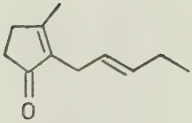
58



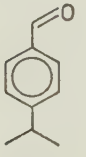
59



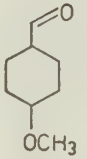
60



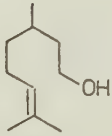
61



63

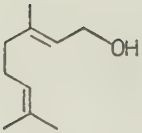


64

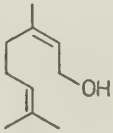


69

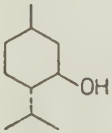
70



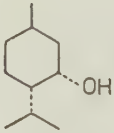
71



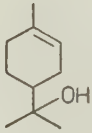
72



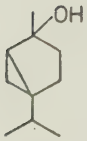
73



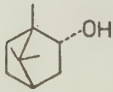
74



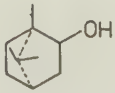
75



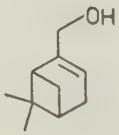
76



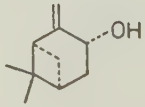
77



78

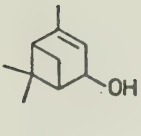


79

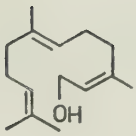


80

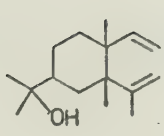
Abb. 2-1 (1. Fortsetzung)



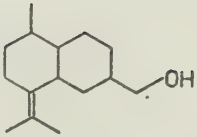
81



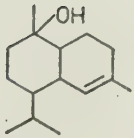
82



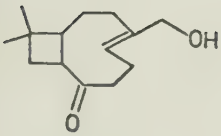
83



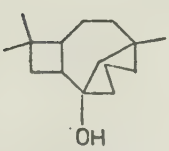
84



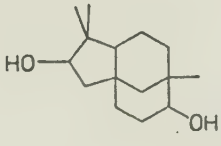
85



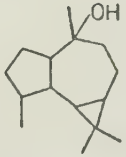
86



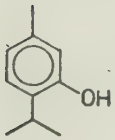
87



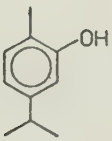
88



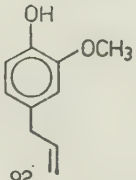
89



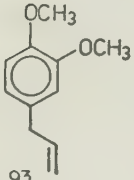
90



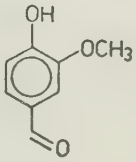
91



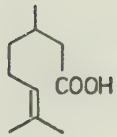
92



93



94



99

Abb. 2-1 (2. Fortsetzung)

Zum Teil sind die zitierten UV-Maxima auch auf Absorptionen einer Verunreinigung zurückzuführen, wie dies z.B. bei dem für Caryophyllen angegebenen Wert von Goodway[50] selbst eingeräumt wird. Solche Fehler können erkannt werden, wenn man die gemessenen Werte mit den nach den Woodward-Regeln[51] berechneten Werten vergleicht. Aber auch die so berechneten Werte können stark von den praktisch ermittelten abweichen, wenn z.B. unbekannt starke Ringspannungen vorliegen, wie sie bei bizyklischen Monoterpenen nicht selten sind.

Weniger genau, jedoch übersichtlicher als die UV-Daten der einzelnen Inhaltsstoffe in Tab. 2-1 sind die in Tab. 2-2 zusammengefaßten Absorptionen der in ätherischen Öl-Inhaltsstoffen häufig vorkommenden Chromophore.

Bei den Brechungsindices[1,52] wurden soweit vorhanden, die n_D-Werte bei 20° C zitiert, um diese besser untereinander vergleichen zu können. Leider weichen die für die gleiche Verbindung in der Literatur wiedergegebenen Werte nicht selten schon in der zweiten Stelle nach dem Komma voneinander ab. Bei neueren Verbindungen finden sich häufig keine Brechungsindices, sondern IR- und NMR-Daten. Für eine bessere Übersicht wurden in Tab. 2-3 die Brechungsindexbereiche der vorkommenden Stoffgruppen aufgrund der in Tab. 2-1 angegebenen Einzelwerte zusammengefaßt.

Die Siedepunkte[1] wurden mitaufgenommen, da sie Rückschlüsse auf das gaschromatographische Verhalten einer Substanz zulassen. Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden sie, wenn auffindbar, für 760 Torr angegeben, auch wenn sich die Substanzen bei diesem Druck nicht unzersetzt verdampfen lassen.

Die Strukturformeln wurden in Abb. 2-1 wiedergegeben, da einmal die Trivialnamen wenig Vorstellung über die Chemie der Stoffe vermitteln und da zum anderen bei fehlenden UV- oder RI-Daten wenigstens diese Anhaltspunkte über die theoretisch zu erwartenden Werte liefern können. Bei einigen Stoffen, besonders bei den Sesquiterpenen, bestehen Unsicherheiten über die Struktur.

Tabelle 2-2: λ_{max} und ε-Werte der in ätherischen Ölen vorkommenden Stoffgruppen nach[51], wenn nichts anderes angegeben ist

Stoffgruppe	λ_{max} (nm)	ε_{max}
Olefine, acyclisch	175-195	10000-15000
Olefine, alicyclisch	190-200	7000-10000
Olefine, α,β-ungesätt., acyclisch	215-240	ca.20000
Olefine, α,β-ungesätt., endocyclisch	240-270	4000-10000
Alkohole, gesättigt	185	ca. 200[49]
Alkohole, α,β-ungesättigt	200	ca.9000
Aldehyde, Ketone, gesättigt	180-190	ca.1000[49]
	270-310	15-40
Aldehyde, α,β-ungesättigt	205-240	8000-16000
Ketone, α,β-ungesätt., acyclisch	220-250	4000-10000
Ketone, α,β-ungesätt., alicyclisch	230-250	5000-10000
Ketone, β,γ-ungesätt., alicyclisch	200-220	200-5000
	270-300	50-300
Ester, Lactone, gesättigt	190-220	30-100[49]
Benzoide Kohlenwasserstoffe	180	ca.47000[49]
	200-210	ca. 8000
	250-275	200-500
Phenole, -äther, monohydroxi-	210-220	ca. 6000
	210-270	1400-2500
Aldehyde, aromatische	240-260	12000-15000
	280-290	1200-1700
	330-350	30-50
Aldehyde, aromatische, mit einer OH- oder CH_3O-Gruppe am Ring	250-280	10000-20000
	320-330	3000-4000
Furane, alkylierte	210-220	5000-6000

Tabelle 2-3: Brechungsindexbereiche (n_D^{20}) für die in äther. Ölen vorkommenden Stoffgruppen, zusammengestellt aus den Werten der Tabelle 2-1

Kohlenwasserstoffe, Monoterpen-	1,46-1,48
Kohlenwasserstoffe, Sesquiterpen-	1,49-1,51
Alkohole, Monoterpen-	1,46-1,49
Alkohole, Sesquiterpen-	1,49-1,51
Aldehyde, Ketone, gesättigt (z.B. Menthon)	1,45
Aldehyde, Ketone, α,β-ungesättigt	1,48-1,49
Aldehyde, Ketone, α,β-ungesätt. + isolierte Doppelbindung	1,49-1,50
Äther (z.B. Cineol)	1,46
Essigsäureester, Monoterpen-	1,44-1,48
aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Cymol)	1,49
Phenole und Phenoläther	1,52-1,53
aromatische Aldehyde (z.B. Anisol)	1,57

2.2 Physikalische und physikalisch-chemische Untersuchungen[53)]

Zur Charakterisierung der vier ätherischen Öle des Handels erschien es zweckmäßig, diese durch einige herkömmliche physikalisch und physikalisch-chemische Methoden zu charakterisieren, die häufig zur Identifizierung und Qualitätskontrolle Verwendung finden und teilweise Eingang in Arzneibücher gefunden haben.

Dichte

Sie ist eine einfach zu bestimmende Stoffkonstante, die für die Beurteilung der Reinheit, Qualität und Herkunft eines ätherischen Öles wichtig ist. Sie nimmt größere Werte an mit steigendem Zyklisierungsgrad, Sauerstoffgehalt und Aromatizität der Inhaltsstoffe und mit zunehmender Alterung des Öles.

Die ermittelten Dichten (Tab. 2-4) stimmen, soweit Vergleiche vorhanden, mit den Angaben verschiedener Pharmakopöen überein. Lediglich der Wert für Melissenöl weicht etwas von der Literatur ab. Nimmt man an, daß es sich bei dem Handelsöl um ein Gemisch aus Citronen- und Citronellöl handelt, so dürfte aufgrund der Dichten und Brechungsindices überwiegend Citronellöl vorliegen.

Tabelle 2-4: Dichten der vier untersuchten äth. Öle und die Dichten vergleichbarer Öle einiger Pharmakopöen

	Analyse[a)]	DAB 7-BRD	Ph. Eur.	Ph. Helv. VI	Literatur
Melissenöl	0,889				0,89-0,96[1)]
Citrusöl		0,850-0,856		0,854-0,861	
Citronellöl				0,881-0,901	0,900-0,920[5)]
Menthaöl	0,903	0,893-0,915	0,900-0,912	0,898-0,915	0,900-0,907[5)]
Pinusöl	0,878				
- von Pinus pum.				0,860-0,875	
- von Abies sib.					0,905-0,925[5)]
Eucalyptusöl	0,917	0,905-0,925	0,906-0,925	0,905-0,930	

a) die mit der Mohr-Westphalschen Waage ermittelten Dichten (d_4^{22}) der untersuchten Öle

Brechungsindices

Diese liegen, soweit vergleichbar, in den von den Pharmakopöen zugelassenen Grenzen (Tab. 2-5).

Tabelle 2-5: n_D^{20}-Werte der vier äther. Öle und die Werte einiger Pharmakopöen

	Analyse[a)]	DAB 7-BRD	Ph. Eur.	Ph. Helv. VI	Literatur
Melissenöl	1,4738				1,490-1,506[1)]
Citrusöl		1,474-1,478		1,474-1,478	1,471-1,476[5)]
Citronellöl				1,463-1,475	1,479-1,494[5)]
Menthaöl	1,4603	1,459-1,470	1,460-1,467	1,459-1,464	1,460-1,464[5)]
Pinusöl	1,4756				
- von Pinus pum.				1,475-1,480	
- von Abies sib.					1,469-1,473[5)]
Eucalyptusöl	1,4613	1,457-1,470	1,458-1,470	1,457-1,469	

a) die mit einem Zeiss Abbé-Refraktometer für die 4 Öle erhaltenen n_D^{20}-Werte

UV-Absorption

Abb. 2-2 zeigt die $E_{1\ cm}^{100\%}$-Werte der vier äther. Öle logarithmisch gegen die Wellenlänge aufgetragen. Sie erlaubt die Aussage, daß gut absorbierende Stoffe in den untersuchten Ölen bei Wellenlängen kleiner 250 nm zu erwarten sind. Maxima zwischen 215 und 250 nm mit großen ε-Werten sind auf Verbindungen mit mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen oder auf α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen zurückzuführen (s.a. Tab. 2-2). Die Extinktion des Melissenöls bei 232 nm (in Heptan) könnte wie bei einigen Lemongras-Ölen[54] allein durch Citral verursacht sein. Würde man den höchsten in der Literatur gefundenen ε-Wert für Citral von 40000[47] als richtig annehmen, so würde sich ein Citral-Gehalt im Melissenöl von $c = \frac{E_{1\ cm}^{100\%} \cdot \text{Molgew.}}{\varepsilon} = \frac{7600 \cdot 152}{40000} = 2{,}9\ \%$ ergeben. Legt man einen mittleren ε-Wert der beiden Werte aus Tab. 2-1 zugrunde (15000), so würde man einen Citral-Gehalt von 7,7 % erhalten. Für den Gehalt an Piperiton (ε bei 228 nm in Heptan: 17500) im Menthaöl würde sich unter der gleichen Annahme ein Gehalt von $c = \frac{4000 \cdot 152}{17500} = 3{,}5\ \%$ errechnen.

Diese Werte stellen - richtige ε-Werte vorausgesetzt - Maximalwerte dar; der wahre Gehalt für Citral oder Piperiton liegt tiefer, wenn in den Ölen noch andere, ähnlich absorbierende Inhaltsstoffe vorliegen, wie etwa α,β-ungesättigte Kohlenwasserstoffe.

Die Absorptionen bei Wellenlängen zwischen 250 und 275 nm werden durch die aromatischen, mittelstark absorbierenden Inhaltsstoffe mitverursacht, z.B. die scharfen Banden im Eucalyptusöl bei 270 nm. Die niedrigen Absorptionsmaxima bei Wellenlängen größer 300 nm sind vermutlich auf $n \rightarrow \pi^*$-Übergänge der Carbonylverbindungen zurückzuführen.

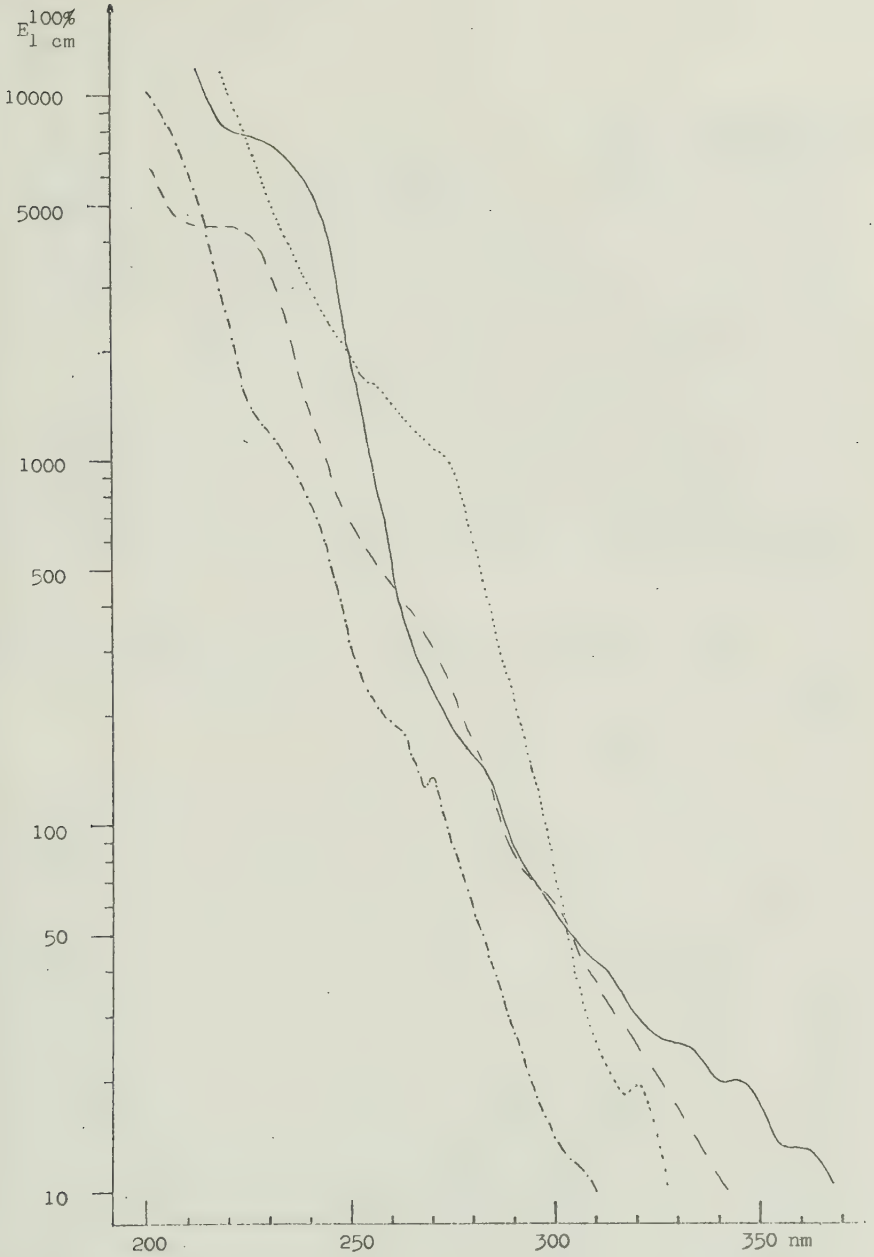
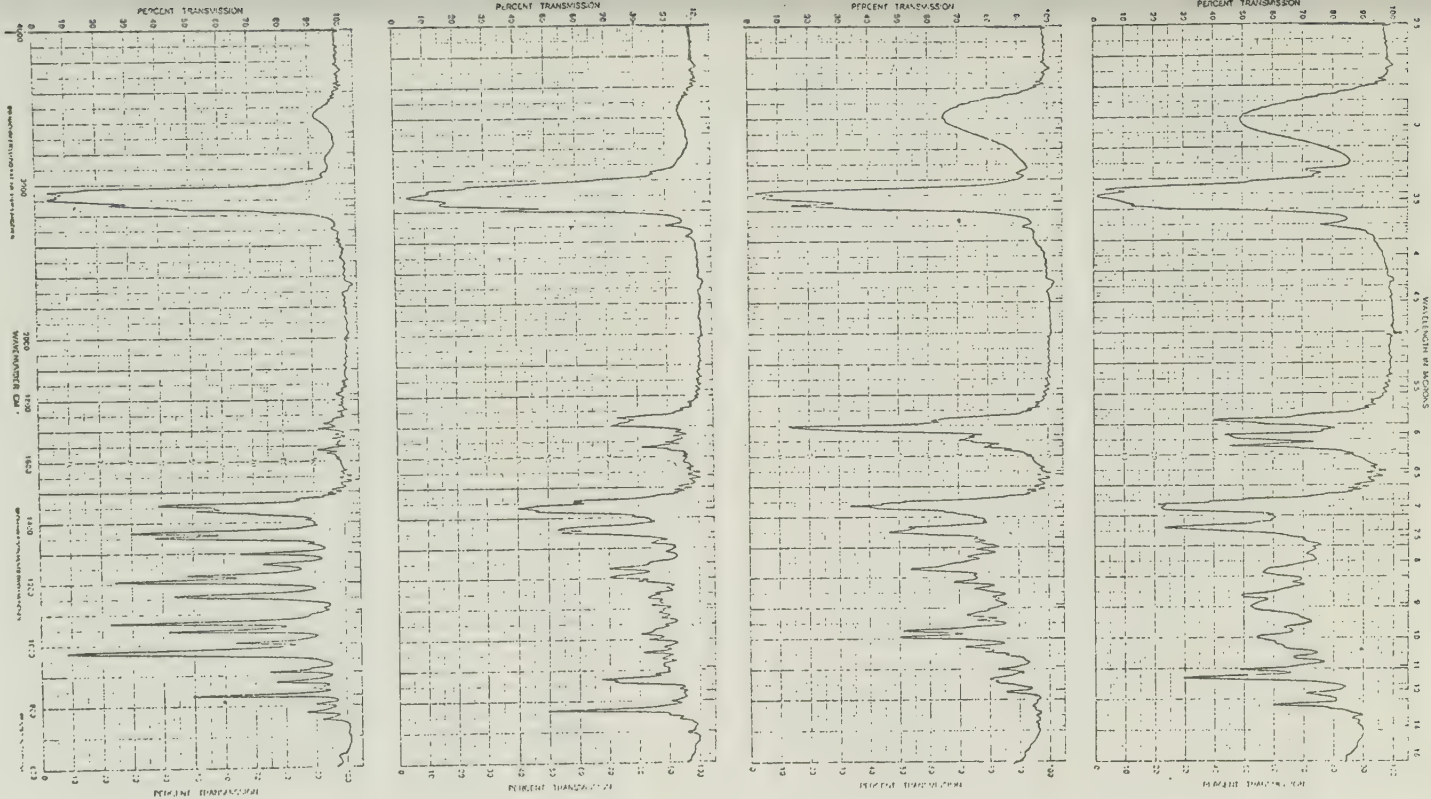


Abb. 2-2: UV-Absorptionskurven ($E_{1\ cm}^{100\%}$) von Melissenöl (———), Menthaöl (----), Pinusöl (....) und Eucalyptusöl (-•••-) in n-Heptan (G/V).

IR-Spektroskopie

Wohl die reichhaltigste Information von den physikalischen Bestimmungsmethoden sowie den modernen spektroskopischen Methoden liefert für die ätherischen Öle die IR-Spektroskopie. Auch wenn die Spektren in der Regel von den Absorptionen der Hauptinhaltsstoffe beherrscht werden, so ist es doch bei einiger Erfahrung möglich, aufgrund der Feinstruktur der Spektren Angaben über Identität, Reinheit, Herkunft oder Alter eines Öles zu machen[7,17,55]. Beispielsweise lassen sich Mentha-piperita-Öle leicht von Mentha-arvensis-Ölen anhand der charakteristischen Banden des Menthofurans bei 732 und 760 cm^{-1} unterscheiden[17]. Auch Aussagen über den Gehalt an Alkoholen oder Carbonylverbindungen sind möglich; diese stimmten mit den chromatographischen Ergebnissen überein.

Abb. 2-3 zeigt die IR-Spektren der 4 ätherischen Öle. (Die OH-Banden sind sehr breit, da unverdünnte Lösungen vermessen wurden.)



Eucalyptusöl Pinusöl Menthaöl Melissenöl

Abb. 2-3: IR-Spektren der ätherischen Öle (unverdünnt als Film)

3. GASCHROMATOGRAPHIE

Unter dem Begriff GC[20,42,44,56-67] werden jene chromatographischen Trennverfahren zusammengefaßt, bei denen die mobile Phase gasförmig ist. Die stationäre Phase kann ein Sorbens mit entsprechend großer Oberfläche sein (Gas-Fest-Chromatographie, GSC) oder eine auf einen festen Träger aufgebrachte Flüssigkeit (Gas-Flüssig-Chromatographie, GLC). Während die GSC mehr für niedermolekulare und thermisch stabile Verbindungen eingesetzt wird, kommt der GLC die breitere Anwendung zu.

Untersuchen lassen sich alle Stoffe, die unzersetzt oder in Bruchstücken nach Pyrolyse in die Dampfphase überführt werden können. Um die Vorzüge der Methode auch für nicht oder nur schwer verdampfbare Stoffe nutzen zu können, erschien es in der Vergangenheit häufig lohnenswert, diese durch Derivatisierung der polaren Gruppen leichter flüchtig zu machen. Viele dieser Stoffe können heute nach den Fortschritten in der Flüssigchromatographie besser durch die HPLC untersucht werden.

Die Bedeutung der GLC für die Analytik der gut verdampfbaren, wenn auch labilen Terpene, läßt sich u.a. an der umfangreichen Literatur[7,8,60,68-73] ablesen.

In den Pharmakopöen, die Rücksicht auch auf kleinere Laboratorien nehmen, und bei der geringen Zahl der anfallenden Proben keinen ungerechtfertigt hohen apparativen Aufwand fordern wollen, wird die GC nur wenig angewandt (Ph.Eur., DAB 7-DDR, DAC) - und in einem Fall auch nur zur Prüfung der Identität und Reinheit eines Stoffes und nicht zur Trennung eines Stoffgemisches (Zinci undecylenas DAC). Die ätherischen Öle werden in verschiedenen Arzneibüchern (Helv. 1971, DAB 7-DDR, Ph.Eur.) durch die einfacher zu handhabende und weniger Ausrüstung erfordernde DC nur auf Identität geprüft. Eine qualitative und quantitative GC-Bestimmung ätherischer Öle ist, soweit bekannt, lediglich für das 2. Arzneibuch der DDR vorgesehen[73].

Im folgenden soll untersucht werden, in welchem Maße und mit welcher Genauigkeit und Richtigkeit sich die einzelnen Öle in Gemischen der vier Öle wiederfinden lassen. Hierzu standen lediglich gepackte Säulen zur Verfügung, mit denen sich im günstigen Fall Trennstufen von 2000/m erreichen lassen. Die volle Leistungsfähigkeit der Methode wurde also nicht ausgeschöpft. Dies erscheint insofern vertretbar, als das Schwergewicht der Arbeit in der Untersuchung der Öle durch die HPLC liegt. Trennstärkere Säulen, wie Dünnfilm- oder Dünnschicht-Kapillaren, würden sicher genauere und richtigere Ergebnisse erbringen, erfordern jedoch neben zusätzlicher Ausrüstung größere Erfahrung und finden relativ langsam Aufnahme in die Routineanalytik. Schließlich hat sich gezeigt, daß bei komplexen Gemischen sich das Trennproblem nicht in dem zu erwartenden Maße vereinfacht, da mit erhöhter Trennstärke viele bis dahin überlagerte Komponenten sichtbar werden.

3.1 Wahl der chromatographischen Bedingungen

Voraussetzung für eine genaue und richtige quantitative GC-Analyse[68,74-80] ist eine möglichst vollständige Abtrennung der zu bestimmenden Verbindungen. Faktoren, die die GC-Trennung beeinflussen, sind:

- Art der stationären Phase und Grad der Imprägnierung
- Oberfläche des Trägermaterials
- Trennstufenzahl der Säule
- Geschwindigkeit (weniger die Art) des Trägergases
- Säulentemperatur(-programm)

3.1.1 Stationäre Phase[z.B.56,68)]

Betrachtet man das Siedeverhalten der ätherischen Öl-Inhaltsstoffe (Tab. 2-1 und 3-1), so wird zweierlei deutlich:

a) besonders die sauerstoffhaltigen Monoterpene - hierher gehören viele der zu erwartenden Verbindungen - sieden sehr ähnlich: die meisten zwischen 210 und 230°C,

b) geht man davon aus, daß eine zu chromatographierende Verbindung bei der betreffenden Säulentemperatur einen Dampfdruck von wenigstens 10 Torr besitzen sollte, so sollte die stationäre Phase bis etwa 200° C anwendbar sein.

Tabelle 3-1: Siedebereiche von äther. Öl-Inhaltsstoffen

155-180° C	Monoterpen-Kohlenwasserstoffe
190-245° C	Monoterpen-oxide, -alkohole, -aldehyde, -ketone, -ester, Phenole, Phenoläther
245-270° C	Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe
höher 280° C	sauerstoffhaltige Sesquiterpene u.a.

Hocherhitzbare stationäre Phasen (bis 300 - 350° C) sind in der Regel unpolar, z.B. Siliconöle. Sie trennen vorwiegend nach Siedepunkten, sie unterschieden also wenig zwischen den chemischen Eigenschaften der Probemoleküle. Polare Verbindungen werden auf ihnen häufig unsymmetrisch eluiert (tailing), besonders wenn das Trägermaterial nicht völlig inert ist. Da auf lipophilen Phasen Kohlenwasserstoffe relativ stärker zurückgehalten werden als die entsprechenden sauerstoffhaltigen Verbindungen, können sich beispielsweise Monoterpen-Kohlenwasserstoffe und die höher siedenden sauerstoffhaltigen Monoterpene überlappen. Nicht zu umgehen sind unpolare stationäre Phasen bei sehr hochsiedenden Verbindungen, wie Di- oder Triterpenen.

Häufiger werden für die ätherischen Öle mittelpolare bis polare stationäre Phasen verwendet (Polyglykole, hochsiedende Ester). Sie sind zwar weniger hitzestabil (max. 250° C), ergeben also

Säulen mit geringerer Lebensdauer und führen bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise besonders bei hoher Empfindlichkeit zu einer Drift der Basislinie. Sie vermögen aber die Terpene mehr nach funktionellen Gruppen und deren Stellung im Molekül zu trennen und besitzen daher zumindest für die sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe eine bessere Selektivität. Stationäre Phasen von der Oberfläche und der Polarität des in der Flüssigchromatographie verwendeten Kieselgels sind für die GC der Terpene nicht denkbar. Einmal fehlen so polare Flüssigkeiten mit entsprechend hoher Temperaturstabilität, zum anderen würden auf diesen beispielsweise Alkohole sehr viel stärker zurückgehalten. Dadurch würden bedeutend höhere Temperaturen erforderlich, die für die Zerstörung vieler Terpenalkohole ausreichend wären.

Mehr zum Kennenlernen der Methode wurde anfangs auch mit unpolaren oder wenig polaren stationären Phasen experimentiert. Am Beispiel des Melissenöls zeigte sich, daß auf SE 30, ein Methylsilicongummi, Limonen zwischen den höher siedenden sauerstoffhaltigen Monoterpenen eluiert wird. Mit SE 52, ein Methylphenylsilicongummi, wurde eine etwas bessere Trennung erhalten, und UCCW 982[72], ein Methylvinylsilicongummi, war eben in der Lage, die Monoterpen-Kohlenwasserstoffe, die sauerstoffhaltigen Monoterpene und die Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe zu trennen. Terpenalkohole wurden auf diesen Phasen mit tailing eluiert. Mit Carbowax 20 M (Polyäthylenglykol 20000) und FFAP (Carbowax 20 M + Nitroterephthalsäure) wurde für die sauerstoffhaltigen Terpene die beste Auflösung erhalten, allerdings überlagerten sich die Retentionsbereiche der sauerstoffhaltigen Monoterpene und der in geringen Mengen vorkommenden Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe.

Für die folgenden Untersuchungen wurde überwiegend PEG 20000 verwendet. Es ist zwar weniger polar als Polyglykole mit niedrigerem Molekulargewicht, zeigt jedoch eine höhere Temperaturstabilität (bis 250° C) und kann in besserer Reinheit gewonnen werden als die niedriger siedenden, flüssigen Polymerfraktionen.

3.1.2 Trägermaterial

Als Trägermaterial wird in der GC häufig Kieselgur verwendet, das auf unterschiedliche Weise vorbehandelt wurde. Im allgemeinen soll die Oberfläche des Trägermaterials > 2 m² pro Meter Säule betragen[56]. Bei mit Säure gewachsenem Kieselgur sollten für die Analyse der empfindlichen Terpene Spuren von Säure nicht mehr vorhanden sein[68].

Bei den eigenen Arbeiten wurde meist mit durch Silanisierung desaktiviertem Kieselgur gearbeitet, allerdings sind auch so polare stationäre Phasen wie Polyäthylenglykole in der Lage, aktive Stellen im Trägermaterial abzusättigen. Es werden jedoch abweichende Elutionsfolgen für PEG auf silanisiertem und nichtsilanisiertem Kieselgur beschrieben[68]. Bei den Vorversuchen ergaben sich schließlich Unterschiede in der Selektivität bei Verwendung von silanisiertem Chromosorb W und silanisiertem Chromosorb G als Trägermaterial, obwohl - soweit dies möglich ist - vergleichbare Imprägnierungen gewählt worden waren: 5 % (G/G) für Chromosorb G mit einer Oberfläche von 0,29 - 0,9 m²/ml und 2 % (G/G) für Chromosorb G mit einer Oberfläche von 0,29 m²/ml[56]. Beispielsweise wurde auf Chromosorb W Hexadecan deutlich vor den beiden Citral-Isomeren eluiert (Abb. 3-4), während es bei Verwendung von Chromosorb G zwischen den beiden Isomeren lag und kaum von Geranial zu trennen war. Ebenso war die Trennung von Geraniol im Melissenöl und der Pinusöl-Komponente mit fast gleichem Retentionsvolumen (Abb. 3-2) auf mit 2 % PEG imprägniertem Chromosorb G schlechter. Da schließlich Citral auf diesen Säulen eine größere Zersetzung aufwies, wurden mit Chromosorb G keine weiteren Versuche mehr angestellt und im folgenden nur mit Chromosorb W gearbeitet.

Die Korngröße des Chromosorb W betrug 0,18 - 0,25 mm (60/80 mesh). Ein feineres Korn von 0,15 - 0,18 (80/100 mesh) würde Säulen mit größerem Druckabfall jedoch höheren Trennstufenzahlen ergeben und wäre bei so komplexen Gemischen eventuell vorzuziehen.

3.1.3 Imprägnierungsgrad[56,63]

Der Grad der Imprägnierung wird in der Regel in g Trennflüssigkeit/g Trägermaterial angegeben. Diese Angabe ist zwar unvollkommen, da das analytische Ergebnis auch von der Oberfläche und der Schüttdichte des Trägermaterials abhängt. Jene Eigenschaften können stark schwanken, doch fehlen häufig genauere Angaben. Für analytische Trennungen werden Imprägnierungen von $\leq$ 20 % bevorzugt. Sie ergeben Säulen mit höherer Trennstufenzahl, besonders bei größeren Trägergasgeschwindigkeiten. Nachteilig kann die geringere Beladbarkeit und die kürzere Lebensdauer dieser Säulen sein. Für die Belegung des Chromosorb W wurde der Imprägnierungsgrad mit 5 % relativ niedrig gewählt. Dies geschah in der Absicht, bei tieferen Säulentemperaturen arbeiten zu können und dadurch die zu trennenden Terpene möglichst wenig thermisch zu belasten. Gleichzeitig wird auch die stationäre Phase weniger beansprucht, so daß die Basisliniendrift bei Temperaturanstieg durch Bluten der stationären Phase eventuell weniger zur Geltung kommt. Bei Imprägnierung von kleiner 2 % auf Chromosorb W dürften Unregelmäßigkeiten zu erwarten sein[81].

3.1.4 Trennstufenzahl[56,60,62,63]

Die Trennstufenzahl oder Zahl der theoretischen Böden dient zur Beurteilung der Qualität einer Säule und zur Kontrolle der Arbeitsbedingungen. Sie ist zur Berechnung der für die Auflösung eines Substanzpaares erforderlichen Säulenlänge des Trägermaterials, von der Gleichmäßigkeit und Dichte der Pakkung, vom Säulendurchmesser, vom Imprägnierungsgrad, von der Art und der Geschwindigkeit des Trägergases, von der Säulentemperatur, von der chromatographierten Substanz vom Retentionsvolumen und schließlich von der Methode, nach der sie errechnet wird.

Die im folgenden angegebenen Werte wurden nach der Formel $N = 5{,}54 \left(\frac{t_{m+s}}{b_{0,5}}\right)^2$ aus den aufgezeichneten Peaks erhalten. Eine andere Formel[63] $N = 2\pi \left(\frac{h \cdot t_{m+s}}{F} \cdot \frac{(mVs)}{(mVs)}\right)^2$, die bei Vorliegen von Integratorflächen nur die Messung der Peakhöhe verlangt, ergab um 5 - 10 % kleinere Werte.

Die in Tab. 3-2 angegebenen Trennstufenzahlen wurden mit der in Abb. 3-1 und 3-2 verwendeten 3 m langen Säule erhalten. In Abhängigkeit vom chromatographierten Stoff sind die Werte stark unterschiedlich; einige Peaks, besonders die der Alkohole, wiesen eine geringe Asymmetrie (fronting) auf. Wie erwartet, nehmen die Trennstufenzahlen mit der Temperatur zu.

Tabelle 3-2: Trennstufenzahlen verschiedener Stoffe, geordnet nach k'-Werten; chromatographische Bedingungen wie in Abb.3-1 außer Säulentemperatur: 120 bzw. 150° C isotherm.

	bei 120° C		bei 150° C	
	N	k'	N	k'
Tetradecan	3500	2,30	-	
Menthon	3700	2,45	-	
Menthofuran	2800	2,50	-	
Pentadecan	3200	3,25	-	
Menthylacetat	3100	3,90	-	
Menthol	3400	5,20	-	
Piperiton	3500	8,20	3700	2,95
Carvon	3300	8,25	3700	2,95
Geraniol	2700	14,5	3400	4,10

3.1.5 Trägergas(-geschwindigkeit)[39f]

In Verbindung mit dem Flammenionisationsdetektor (FID) wurde Stickstoff als Trägergas verwendet, der geringere Trennstufenhöhen ermöglicht als Helium oder der weniger viskose Wasserstoff. Die Durchflußrate wurde so eingestellt, daß die mittlere lineare

Gasgeschwindigkeit zwischen 5 und 10 cm/sec betrug. (Eine Durchflußrate von 20 ml N_2/min entspricht für die in Abb. 3-1 verwendete Kupfersäule mit ca. 2 mm i.D. einer mittleren linearen Gasgeschwindigkeit von 7 cm/sec.) Die Durchflußraten wurden am Säulenende mit Hilfe eines Seifenblasenmessers ermittelt.

3.1.6 Temperatur(-programm)

Die Säulentemperatur ist je nach Trennproblem verschieden. In den wenigsten Fällen konnte eine Analyse bei konstanter Temperatur (isotherm) ausgeführt werden. Eine Temperatur von 170° C brauchte für die Elution der sauerstoffhaltigen Monoterpene nicht überschritten zu werden. Ziegler[82] gibt diese Temperatur als Grenze an, oberhalb welcher in vermehrtem Maße Zersetzungen empfindlicher Aromastoffe auf Metallsäulen beobachtet werden. Temperaturen über 170° C wären bei den verwendeten Bedingungen für die Elution sauerstoffhaltiger Sesquiterpene erforderlich. Schließlich sei erwähnt, daß die Trennung einiger Substanzpaare von der Temperatur abhing, z.B. Geraniol und die ähnlich zurückgehaltene Komponente des Pinusöls (Abb. 3-2), bei der es sich um einen Kohlenwasserstoff - vermutlich um ein Sesquiterpen - handelt. (Der Pinusöl-Inhaltsstoff läßt sich auf Kieselgel mit Hexan eluieren.)

3.2 Trennungen der vier ätherischen Öle

Abb. 3-1 und 3-2 geben die Trennungen der vier Öle auf 5 % PEG 20000/Chromosorb W bei einer Trennstufenzahl von etwa 3000 wieder. Einige Peaks wurden durch Retentionszeiten-Vergleich entsprechenden Inhaltsstoffen zugeordnet. Streng genommen ist dies noch kein endgültiger Beweis für die Identität oder Einheitlichkeit der Peaks, sondern besagt nur, daß die bezeichneten Inhaltsstoffe an dieser Stelle im Chromatogramm eluiert

werden. Aufgrund der Peakflächen und der in der Flüssigchromatographie gefundenen Ergebnisse kann die Identität jedoch als gesichert angenommen werden.

Die Abb. 3-1 zeigt, daß bei den gewählten Bedingungen die im ersten Drittel eluierten Monoterpen-Kohlenwasserstoffe (und Cineol und p-Cymol) relativ wenig getrennt werden. Eine bessere Auflösung dieser Inhaltsstoffe wäre möglich bei größeren Retentionsvolumina, z.B.

- durch eine weniger polare stationäre Phase, die die lipophilen Inhaltsstoffe stärker zurückhält,
- durch ein größeres Volumen an stationärer Phase und/oder
- durch niedrigere Säulentemperaturen.

Letzteres wäre am einfachsten zu verwirklichen, ist aber in diesem Fall nicht durchführbar, da die für die stationäre Phase empfohlene untere Arbeitstemperatur (80 - 100° C) zu sehr unterschritten würde, und der Gaschromatograph so niedere Temperaturen nicht leicht konstant hält. Die anderen Parameter zu ändern würde die Trennbedingungen für die sauerstoffhaltigen, später eluierten Verbindungen verschlechtern, so daß mit verschiedenen Säulen gearbeitet werden müßte.

Aus den folgenden Gründen erschien jedoch eine quantitative Bestimmung der Monoterpen-Kohlenwasserstoffe nicht vorteilhaft:

- Sie gelten aufgrund der geringen Strukturunterschiede allgemein als schwer trennbar. Kubeczka z.B.[67] empfiehlt für diese Stoffe Kapillarsäulen nach flüssigchromatographischer Vortrennung.
- Durch ihre relativ leichte Flüchtigkeit sind sie schwer quantitativ aus Zubereitungen abzutrennen.
- Sie kommen praktisch überall im Pflanzenreich vor; für eine botanische Art typische Inhaltsstoffe sind eher bei den sauerstoffhaltigen Terpenen zu finden.
- Die GC-Bestimmung der später eluierten Verbindungen erlaubt eher eine isotherme Arbeitsweise.

In Abb. 3-2 wurden zum besseren Vergleich der Retentionszeiten der stärker zurückgehaltenen Komponenten (sauerstoffhaltige Monoterpene und Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe) die vier Öle und ein Gemisch aller vier Öle auf derselben Säule bei langsamerer Heizrate und kleinerer Trägergasgeschwindigkeit eluiert, aber nur teilweise besser getrennt.

Tab. 3-3 gibt die Retentionszeiten verschiedener Inhaltsstoffe und möglicher interner Standards bei 120° C Säulentemperatur wieder. Trotz des geringen Zahlenmaterials läßt sich zeigen, daß mehrere Inhaltsstoffe unter einem Peak liegen können, ohne daß dies an der Peakform erkenntlich wäre.

Tabelle 3-3: Retentionszeiten einiger Vergleichsstoffe (in min.) bei gleichen chromatographischen Bedingungen wie in Abb. 3-1, aber mit 120° C Säulentemperatur

Methan	0,71	Myrtenal	4,45
Limonen	1,14	Hexadecan	4,55
Cineol	1,17	Pulegon	4,75
p-Cymol	1,32	Neral	5,30
Cyclohexylacetat	1,65	Borneol	5,60
Fenchon	2,00	Terpineol	5,60
Octen-3-ol	2,05	2-Undecanol	6,30
Tetradecan	2,35	Geranial	6,50
Citronellal	2,50	Piperiton	6,55
Menthon	2,50	Carvon	6,60
Menthofuran	2,55	Nerol	7,50
Linalool	2,95	Geranylacetat	7,50
Campher	3,00	Anethol	9,55
Pentadecan	3,00	Geraniol	10,95
Linalylacetat	3,25	Undecanol	12,10
Menthylacetat	3,45	Dodecanol	19,60
Pinocarvon	3,55	Anisaldehyd	21,70
Bornylacetat	3,65	Methyleugenol	23,30
Neomenthol	3,70	Eugenol	43,00
Caryohyllen	4,15	Carvacrol	56,00
Menthol	4,40		

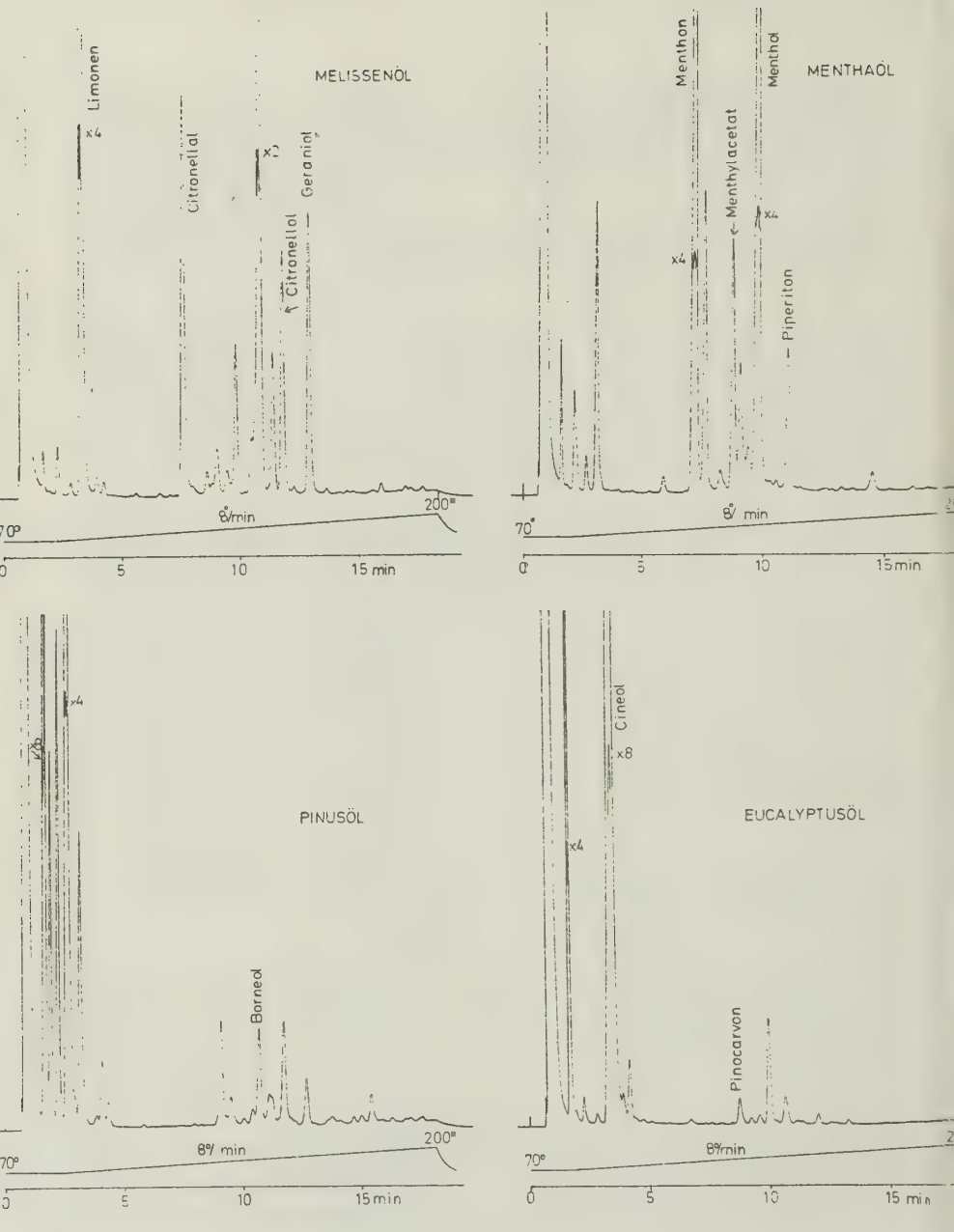


Abb. 3-1: Je 20 nl Öl (zu 2 % in Heptan gelöst); 3 m Kupfersäule, 1/8", etwa 2,5 mm i. 5 % PEG 20000 auf Chromosorb W AW DMCS 0,18 - 0,25 mm;
Temperaturen: Injektionsblock (Stahl) 250°C, Detektor (FID) 250°C,
Säule: 2 min bei 70°, dann mit 8°/min bis 200°; 20 ml N_2/min.

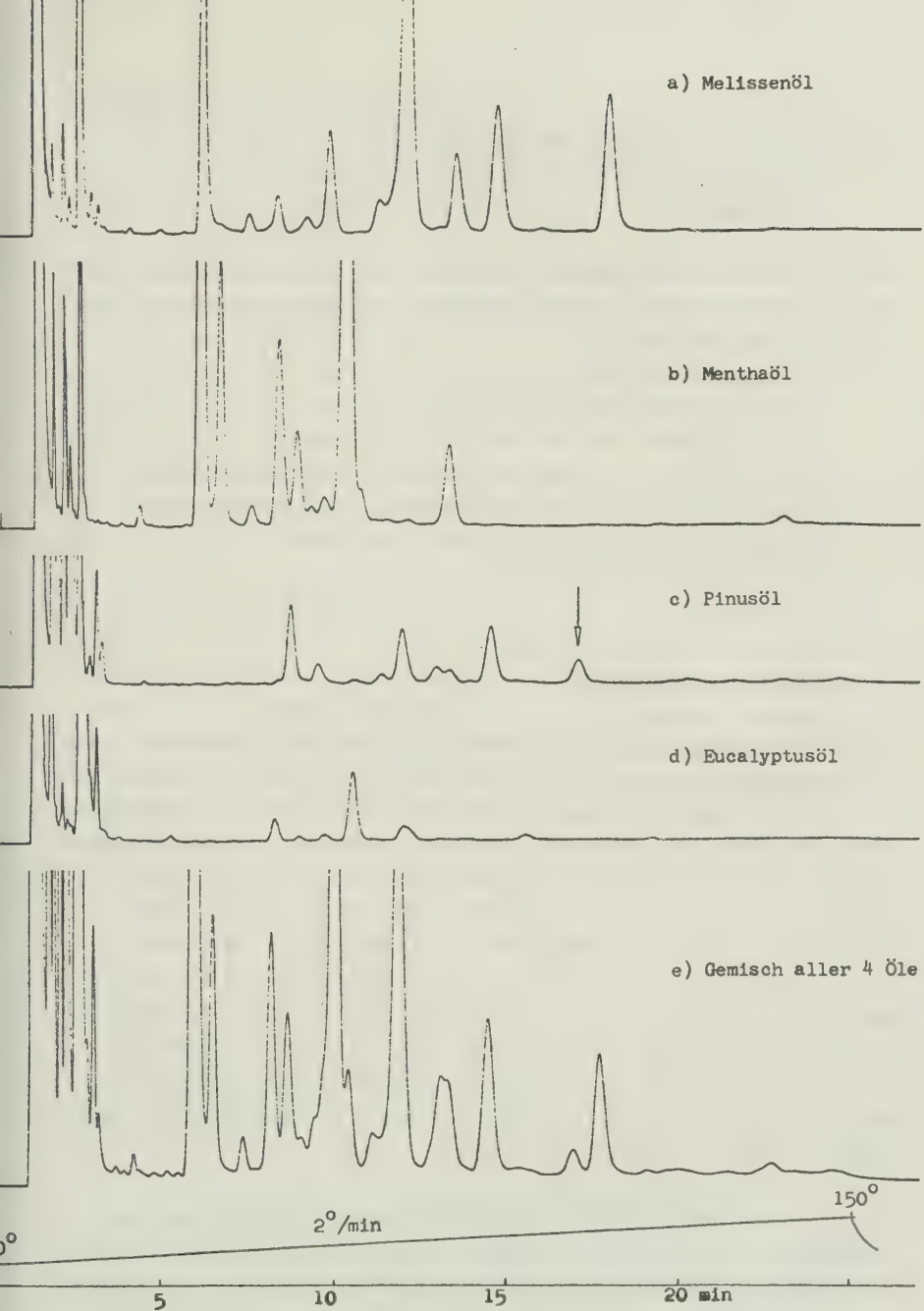


Abb 3-2: Gleiche Bedingungen wie in Abb. 3-1 außer: Säulentemperatur 100 - 150° mit 2°/min; 10 ml N_2/min; für Chromatogramm e) wurde die Registrierempfindlichkeit um den Faktor 4 erhöht.

3.3 Faktoren, die die quantitative GC-Analyse[56,60,62,63,65,69,75-80] beeinflussen

Eine möglichst vollständige Trennung der zu bestimmenden Komponenten vorausgesetzt, beeinflussen u.a. folgende Faktoren die quantitative Analyse:

Probenvorbereitung
Art und Genauigkeit der Probendosierung
Stoffveränderungen vor oder auf der Säule
Linearität von Detektor und Registriereinrichtung
Das zum Ausmessen der Peakflächen gewählte Verfahren
Umwandlung der Meßwerte in Analysenwerte.

3.3.1 Probenvorbereitung

Es erwies sich nicht als gleichgültig, welches Lösemittel zum Verdünnen der ätherischen Öle und der Vergleichsstoffe verwendet wurde. Beispielsweise zeigten Citrallösungen nur eine geringe Haltbarkeit in Methanol. Die Zersetzung war abhängig von der Zeit (Abb. 3-3) und bei schlechten Methanolqualitäten größer; eine Abhängigkeit von der Größe des überstehenden Luftraumes wurde nicht gefunden. Von den weniger polaren Lösemitteln geben die Chlorkohlenwasserstoffe zwar kleinere Lösemittelpeaks, da sie vergleichsweise gering durch den FID angezeigt werden, doch besitzen sie eine allgemein geringere Stabilität. Auch wurde befürchtet, daß durch sich abspaltendes HCl die Lebensdauer der Säule beeinträchtigt und der Detektor auf die Dauer leiden würde.

Bei den gesättigten Kohlenwasserstoffen ist theoretisch am wenigsten mit Stoffveränderungen zu rechnen. Sie zeigen mit PEG weniger Wechselwirkungen als polarere Lösemittel, woraus u.a. ein geringeres Tailing des Lösemittel-Peaks resultiert. Da bei den höher siedenden Kohlenwasserstoffen infolge geringerer Verdunstung weniger mit Fehlern bei der Bereitung und

Aufbewahrung der Lösungen zu rechnen ist, wurde jenen der Vorzug gegeben, zumal sie bei den verwendeten Säulentemperaturen kaum breitere Lösemittel-Peaks als die niedriger siedenden Kohlenwasserstoffe ergaben. Cyclohexan enthält häufig Benzol, das auf PEG als getrennter Peak eluiert wird; es wurden daher Heptan oder Isooctan zum Lösen der Proben verwendet. Die Löslichkeit der Öl-Inhaltsstoffe in Kohlenwasserstoffen ist für die geringen erforderlichen Konzentrationen ausreichend. Für die Bestimmungen der ätherischen Öle wurden meist 0,4 bis 2 proz. Lösungen bei 2 µl Probevolumen verwendet.

Die Substanzmenge, die auf eine GC-Säule aufgegeben wird, kann abhängig sein von der Konzentration, in der die zu bestimmende Komponente im Gemisch vorkommt, von der Retentionszeit derselben und von der Beladbarkeit der Säule. Allgemein sind für die elektronische Integration möglichst hohe Probemengen erwünscht, so daß diese nicht erschwert wird durch Grundlinienrauschen oder durch fallende und aufsteigende Grundlinie, verursacht durch Lösemittel-Tailing bzw. zunehmendes Abdampfen der stationären Phase bei Temperaturprogramm. Andrerseits soll die Probemenge so klein sein, daß Überladung der Säule bzw. des Detektors oder stärkere Verschmutzung der Säule durch schwer eluierbare Probenanteile vermieden werden.

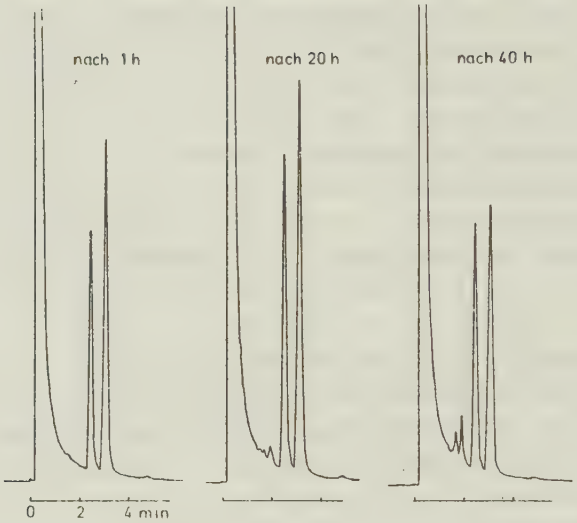


Abb. 3-3: Haltbarkeit von methanolischen Citrallösungen.
Je 1,5 µl der etwa 0,1 proz. Lösungen von Citral, 99,5 %, in Methanol reinst (Merck Art. 6008), die 1, 20, bzw. 40 h bei Raumtemperatur aufbewahrt worden waren; Glassäule 1,8 m, 2 mm i.D.; Säulenfüllung wie in Abb. 3-1; Inj. (Glas) 250°, Säule 120°, Detektor 250°C; 20 ml N_2/min.

3.3.2 Art und Genauigkeit der Probendosierung

Flüssige Proben werden praktisch nur mit Hilfe von Microliter-Spritzen auf die Säule gegeben. Die Probenaufgabe trägt vermutlich am meisten zum Gesamtfehler der Methode bei. Grant et al.[83b)] untersuchten eingehend die Faktoren, die die Genauigkeit der Dosierung mit den üblichen Microliterspritzen beeinflussen. Für die Probenverdampfung fanden sie u.a., daß nieder- und mittelsiedende Stoffe (kleiner 200° C) bei 'on column'-Injektion weniger streuende Werte ergeben. Bei höher siedenden Verbindungen dagegen brachte die Verdampfung in dem Rohr des

höher erhitzten Injektionsblockes bessere Ergebnisse. Die Autoren empfehlen 'on column'-Injektion unter zusätzlicher Beheizung des Säulenanfangs.

Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen betrugen in obiger Untersuchung bei vernünftiger Handhabung der 1 µl "plunger-in-the-needle"-Spritzen (Stempel in der Kanüle) 0,3 - 0,9 %. Bei eigenen Untersuchungen waren für 10 µl Spritzen (Hamilton 701 N) folgende relative Standardabweichungen gefunden worden:

a) bei manueller Probenaufgabe
   für 1 µl Probevolumen: ± 2,3 % (n = 13)
   für 3 µl Probevolumen: ± 0,6 % (n = 10)
   für 5 µl Probevolumen: ± 1,8 % (n = 10)

b) bei Dosierung mit dem automatischen Probengeber (hp 7671 A)
   für 1,5 µl Probevolumen: ± 1,7 % (n = 9)
   für 3 µl Probevolumen: ± 0,6 % (n = 8)
   für 5 µl Probevolumen: ± 0,2 % (n = 6)

Die Werte geben einen Hinweis auf die mit den verwendeten Spritzen zu erwartende Streuung. Für einen Vergleich zwischen automatischer und manueller Probendosierung sind sie nicht ausreichend. Einmal wurde mit zwei verschiedenen Spritzen gearbeitet, von denen eine evtl. weniger dicht war, zum anderen hängt bei der manuellen Probenaufgabe die Genauigkeit von der Arbeitsweise der ausführenden Person ab.

Bei den verwendeten 10 µl Spritzen ist schließlich zu berücksichtigen, daß nicht nur das am Spritzenkolben abgelesene Volumen dosiert wird, sondern daß auch das in der Spritzennadel befindliche Volumen (0,5 - 0,9 µl) teilweise durch die Wärme des Injektors verdampft. Inwieweit aus dem Kanülenvolumen die gelösten Probesubstanzen mitverdampfen, hängt ab von der Verdampfbarkeit der Probesubstanzen und der Zeit, die die Spritze im Injektor verweilt. Durch das Totvolumen der Spritze entstehen also Streuungsfehler - besonders bei der schlechter repro-

duzierbaren manuellen Probendosierung. Diese unsystematischen Fehler beeinflussen vor allem bei der externen Standardisierung die Genauigkeit des Endergebnisses. Aber auch systematische Fehler können auf diese Weise entstehen, wenn wie bei der 100 %-Methode oder bei der internen Standardisierung Peakflächen von Stoffen verglichen werden, die unterschiedlich stark mit dem Lösemittel aus der Kanüle verdampfen.

Für die folgenden quantitativen Bestimmungen wurde ausschließlich die automatische Probenaufgabe verwendet. Kleinere systematische und unsystematische Fehler wären bei Spritzen zu erwarten, die auch bei kleineren Volumina genauer arbeiten, z.B. mit "plunger-in-the-needle"-Typen (vgl. auch die Arbeiten von Grant[83b]). Bei gleicher Probenmenge aber größerer Probenkonzentration würde u.U. die automatische Integration jener Peaks sicherer, die auf dem Lösemittel-Tailing sitzen, da der Lm-Peak relativ kleiner wird.

3.3.3 Stoffveränderungen vor und auf der Säule und die Faktoren, die diese beeinflussen (Probenverdampfung, Probenkonzentration, Säulenwandmaterial, Säulentemperatur, Säulenlänge) und Tests der Säulen auf Stoffveränderungen

Wie zuvor erwähnt, ist die Art der Probenverdampfung für die Genauigkeit der Peakhöhen wie auch der Peakflächen von Bedeutung. Größere und systematische Fehler entstehen jedoch, wenn sich Substanzen bei der Verdampfung oder auf der Trennsäule verändern. Dies gilt im besonderen für die empfindlicheren Terpene[14-18,84].

Im allgemeinen werden bei empfindlichen Substanzen Glassäulen, Glaseinsätze im Injektionsblock oder gar All-Glas-Systeme bevorzugt. Die katalytische Wirkung von Metalloberflächen auf ätherische Öl-Inhaltsstoffe ist bekannt, allerdings gehen die Meinungen über das Ausmaß der Zersetzung auseinander. Dies ist

erklärlich, da sich einmal die Einspritzblocks in Form, Oberfläche und Temperatur unterscheiden und zum anderen Materialunterschiede bei den Metallsäulen bestehen. Auch ist die Art der Reinigung der Metallsäulen von Bedeutung und schließlich wird in der Literatur nicht immer versucht, die Innenwände der Metallsäulen zu desaktivieren, wie z.B. bei Hefendehl[27]. Um einen Eindruck von der Größe der Stoffveränderungen bei verschiedenen Arten der Probenverdampfung, und vor allem um die gefüllten Säulen auch bezüglich der zersetzenden Eigenschaften beurteilen zu können, wurden alle Säulen nach dem Konditionieren und von Zeit zu Zeit während der quantitativen Arbeiten einem von Brandauer und Ziegler[84] empfohlenen Test unterzogen.

Dieser beruht auf dem Vergleich der Peakflächen eines sehr stabilen Stoffes mit der eines sehr empfindlichen Stoffes bei unterschiedlicher Temperatur und Probemenge. Als stabiler Stoff diente n-Hexadecan, als empfindlicher Stoff Citral, ein in der Natur vorkommendes Isomeren-Gemisch (cis-trans) als wechselnden Mengen Neral und Geranial. Abb. 3-4 zeigt eines der erhaltenen Chromatogramme.

Abb. 3-4:

1,5 µl der Testlösung mit 0,1 % Citral und 0,05 % n-Hexadecan in Heptan;
Säule wie in Abb. 3-3 (= Säule E in Tab. 3-5);
Inj. (Glas) 250°C, Säule 140°C und Det. 250°C;
10 ml N_2/min

1 = n-Hexadecan
2 = Neral (cis-Citral)
3 = Geranial (trans-Citral)

Für die Berechnung des zu erwartenden Peakflächenverhältnisses sind neben der Einwaage noch stoffspezifische Korrekturfaktoren notwendig, da der FID je nach Art der Kohlenstoffbindungen im Molekül sehr unterschiedliche Signale liefert.

Am genauesten werden Korrekturfaktoren ermittelt durch Vergleichen von Einwaagen und Peakflächen der zu bestimmenden Substanz mit denen einer Standardsubstanz. Da für Citral nicht bekannt war, in welchem Maße es sich zersetzen würde, wurde der Korrekturfaktor nach der bei Kaiser[56] angegebenen Formel berechnet:

$$\text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Mol.Gew}}{\text{verfügbare C-Atome} \times 12}$$

(Verfügbar sind jene Kohlenstoffatome, die nur an Kohlenstoff oder Wasserstoff gebunden sind, teilweise verfügbar sind jene, die nur eine Bindung zu einem elektronegativeren Element haben und nicht verfügbar sind die, die mehr als 2 derartige Bindungen aufweisen.) Die auf diese Weise erhaltenen Korrekturfaktoren sind zwar weniger genau, können jedoch größere systematische Fehler in der quantitativen Analyse vermeiden helfen. Für Citral wurde ein Faktor von 1,41 und für Hexadecan ein Faktor von 1,18 errechnet. Für die hergestellte Stammlösung mit 1003,0 mg Citral und 488,0 mg Hexadecan (in 10 ml Heptan) ergibt sich somit ein zu erwartendes Peakflächenverhältnis von:

$$\frac{\text{Fläche}_{\text{Hexadecan}}}{\text{Fläche}_{\text{Citral}}} = \frac{488 \cdot 1{,}41}{1003 \cdot 1{,}18} = \frac{0{,}58}{1} = \frac{1}{1{,}72}$$

In den Tabellen 9 und 10 sind die relativen Peakflächen für Citral wiedergegeben (Hexadecan = 1). Um Streuungsfehler möglichst auszuschließen - die ersten Einspritzungen ergaben häufig kleinere Konzentrationen für Citral - wurden die Mittelwerte aus je fünf Trennungen verwendet. Die Streuung der Werte ist durch die Standardabweichung wiedergegeben. Diese wurde nach der folgenden Näherungsgleichung berechnet:

$$s = \frac{\sqrt{\Sigma\ (\bar{x} - x_i)^2}}{n - 1}$$

Der aus den Peakflächen berechnete Anteil des Nerals (cis-Isomer) im Gesamtcitral schwankte zwischen 35,0 und 36,2 %. Diese Abweichung könnte durch die leichtere Veränderbarkeit des Nerals (Cyclisierung) erklärt werden. Für eine cis-trans-Umwandlung ergaben sich keine Anhaltspunkte. Neben den unterschiedlichen Werten für Citral relativ zu Hexadecan kann auch das streuende Verhältnis Neral : Geranial als Hinweis auf Stoffveränderungen gewertet werden.

In Tab. 3-4 sind die Werte einer Glas- und einer Stahlsäule von gleicher Länge mit derselben Säulenfüllung (wie in Abb. 4) bei unterschiedlicher Säulentemperatur und Probenkonzentration gegenübergestellt.

Säule A: eine Glassäule mit 'on column'-Probenaufgabe, d.h. die Glassäule reicht in den Injektionsblock hinein bis beinahe zum Septum und ist so weit mit Trennkörper gefüllt, daß die Spritze kurz vor der Säulenpackung entleert wird. Ein Nachteil dieser Probenaufgabe ist, daß die ersten cm der Säulenfüllung durch die höhere Temperatur des Injektionsblockes, durch den Kontakt mit der noch flüssigen Probe und durch Anreicherung von nicht verdampfbaren Probenbestandteilen schneller zerstört werden kann. Als wenig vorteilhaft wurde auch das relativ starke Tailing des Lösemittelpeaks für die automatische elektronische Integration empfunden. Da die Breite der Substanzpeaks eine schlechte Säulenpackung ausschlossen, wurde das Tailing des Lösemittels auf die langsamere Verdampfung infolge schlechter Wärmeübertragung durch die 2 mm dicke Glaswand der Säule erklärt.

Säule B: Stahlsäule mit Glaseinsatz im Injektionsblock. Vergleiche mit und ohne Glaseinsatz wurden nicht angestellt, da die zerstörende Wirkung der heißen Metalloberfläche (200° oder 250° C) für Citral oder andere empfindliche Terpene nicht in Frage gestellt wurde. Die Lösemittelpeaks sind bei Verwen-

dung des Glaseinsatzes nur geringfügig breiter als beim Metalleinsatz im Injektionsblock.

In Tab. 3-5 sind einige Testergebnisse der später hergestellten Säulen wiedergegeben. Es wurde nur noch mit der am schwächsten konzentrierten, 0,1 proz. Citral-Lösung und nur noch bei der Säulentemperatur gearbeitet, die eine noch ausreichende Trennung erlaubte. Säule A und B sind identisch mit den Säulen in Tab. 3-4. Die Werte wurden zu einem späteren Zeitpunkt ermittelt und sprechen nicht für eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse.

Tabelle 3-4: Relative Peakflächen des Citrals (Peakfläche des Hexadecans = 1) bei unterschiedlichen Probenkonzentrationen und Säulentemperaturen; Trennfüllung wie in Abb. 3-1; Temperatur des Injektions- und Detektorblocks: 250° C; Probevolumen 1 µl; die Trägergasgeschwindigkeiten wurden so eingestellt, daß sich etwa gleiche Aufenthaltszeiten der Probe in der Säule ergeben ($\bar{u}_{lin}$ = 5 cm/sec)

Säule A: Glassäule, 1,8 m, 2 mm i.D., mit "on column"-Einspritzung, N = 1700 für Geranial bei 110° C (k' = 25)

Säulentemperatur	110° C	130° C
Probenkonzentration 0,1 %	1,664 ± 0,024	1,653 ± 0,017
(Citral in Heptan) 1,0 %	1,704 ± 0,044	1,680 ± 0,026

Säule B: Stahlsäule 1,8 m, 2,5 mm i.D., Glaseinsatz im Injektionsblock, N = 1400 für Geranial bei 110° C (k' = 25)

Säulentemperatur	110° C	130° C
Probenkonzentration 0,1 %	1,638 ± 0,042	1,625 ± 0,025
(Citral in Heptan) 1,0 %	1,673 ± 0,017	1,630 ± 0,019

Tabelle 3-5: Relative Peakflächen des Citrals (Peakfläche des Hexadecans = 1) auf verschiedenen Säulen; Trennfüllung wie in Abb. 3-1; Probemenge: 1 µl einer Lösung von 0,1 % Citral und 0,05 % Hexadecan in Heptan; Trägergasgeschwindigkeit u_{lin} = 5 cm/sec

Säule A: wie in Tab. 3-4

Säule B: wie in Tab. 3-4

Säule C: Kupfersäule, 3 m, ca. 2 mm i.D., N = 3800 für Geranial bei 110° C (k' etwa 25)

Säule D: Glassäule, 3,7 m, 2 mm i.D., N = 4900 für Geranial bei 140° C

Säule E: Glassäule, 1,8 m, 2 mm i.D., N = 3300 für Geranial bei 150° C (k' = 18)

Säulentemperatur	110° C	140° C	170° C
Säule A	1,634 ± 0,018	1,657 ± 0,008	1,647 ± 0,006
B	1,688 ± 0,044	1,670 ± 0,031	1,630 ± 0,032
C		1,605 ± 0,035	
D		1,785 ± 0,049	
E		1,691 ± 0,022	

Auch wenn die zerstörenden Wirkungen der Säulen in Tab. 3-4 und 3-5 nicht das in der Literatur beschriebene und erwartete Ausmaß zeigten, so lassen sich doch die Faktoren, die die Stoffveränderung beeinflussen, in etwa erkennen.

Einfluß der Probenverdampfung:

Für einen Beweis, daß die 'on column'-Injektion die schonendere Probenaufgabe ist gegenüber der Verdampfung vom Glaseinsatz des Injektionsblockes, sind die Werte nicht ausreichend, allenfalls lassen sich bei der 'on column'-Injektion die Zersetzungen besser reproduzieren (s. rel. Standardabweichungen in Tab. 3-4 und 3-5). Auch die höhere Trennstufenzahl der Säule A gegenüber der Säule B in Tab. 3-4 und 3-5 ist vermutlich nicht durch die Art der Probenaufgabe verursacht, da mit gepackten Glassäulen allgemein höhere Trennstufenzahlen als mit Metallsäulen erreicht werden.

Den Einfluß der bei unterschiedlicher Probenverdampfung angewandten Temperatur zeigte Bruhn[18] am Beispiel des Petitgrainöles. Die Zersetzung des Linalylacetats nahm bei Temperaturen größer 200° C stetig zu und war bei 350° C Injektortemperatur vollständig.

Einfluß der Probenkonzentration:
Wie erwartet wirken sich die zerstörenden Eigenschaften des GC-Systems bei der 0,1 proz. Citrallösung stärker aus als bei der 1 proz. Lösung. Für die 10 proz. Lösung konnten keine Werte ermittelt werden, da durch Überladung der Säule die Trennung Hexadecan - Neral verloren ging (Pentadecan stand nicht zur Verfügung). Aber auch bei vollständiger Trennung auf Säulen mit höherer Kapazität wären die mit 10 proz. Lösungen erhaltenen Flächenwerte mit Vorsicht zu verwenden, da Mengen in diesem Konzentrationsbereich außerhalb des linearen Bereichs des Detektors liegen können (s. 3.3.4).

Einfluß der Säulenwand:
Das am wenigsten befriedigende Ergebnis lieferte die 3 m Kupfersäule (Säule C in Tab. 3-5). Gegenüber der berechneten, theoretisch zu erwartenden relativen Peakfläche für Citral von 1,72 (s.o.) war der Wert um 6,5 % zu klein, verglichen mit dem größten gefundenen Gehalt an Citral (Säule D in Tab. 3-5), lag der Wert der Kupfersäule 10 % zu tief. Das ungünstige Verhalten von Kupfer, besonders bei der Analyse ätherischer Öle, ist bekannt[69,20]. Demgegenüber sind die auf Stahlsäulen gefundenen Zersetzungen nicht so deutlich, auch wenn Glassäulen der Vorzug zu geben ist[82]. Für die folgenden Bestimmungen wurden so weit wie möglich Glassäulen verwendet.

Einfluß der Säulentemperatur:
Der ungünstige Einfluß der Temperaturerhöhung ist erkennbar (Tab. 3-4), wenn auch nicht in so starkem Maße, wie von Brandauer und Ziegler[84] beschrieben. Diese erhielten einen Verlust von 40 % an Citral bei 140° C gegenüber nur 20 % Verlust bei 110° C. (Sie arbeiteten mit einer 2 m Stahlsäule, 1/8", gepackt mit 1 % PEG 20000 auf silanisiertem Chromosorb G.)

Für einen systematischeren Vergleich sollte auch der Einfluß der Aufenthaltszeit der Stoffe in der Säule bekannt sein. Diese verringert bei einer Temperaturerhöhung von 25 - 30° C nach einer Faustregel um etwa die Hälfte.

Einfluß der Säulenlänge:

Neben der Säulentemperatur hat auch die Säulenlänge (Zahl der aktiven Stellen) einen Einfluß auf das Ausmaß der Zersetzung. Dies verdeutlichen die Arbeiten von Farnow[69] und Brandauer und Ziegler[84]. Farnow arbeitete mit cis- und trans-Farnesol auf gepackten Säulen und auf Kapillarsäulen. Bei vergleichbaren Analysenzeiten zeigte die 2 m gepackte Säule eine größere Zersetzung als die 100 m Metall-Kapillarsäule. Auf einer nur 1 m langen gepackten Metallsäule wurde ein annehmbareres Ergebnis erzielt als auf der 2 m langen Säule. Brandauer und Ziegler hatten nach Halbierung der Säulenlänge auf 1 m einen Verlust an Citral von nur 10 % gegenüber 20 % auf der 2 m langen gepackten Säule.

Abschließend zu den Tests bezüglich der zersetzenden Eigenschaften des GC-Systems nach Brandauer und Ziegler[84] sei noch erwähnt: Der Test ist ohne Zweifel einer bloßen Betrachtung der Chromatogramme überlegen. Bei den in Tab. 3-4 und 3-5 angeführten Säulen konnte in keinem Fall eine Zersetzung anhand der Peakformen erkannt werden. Das kann heißen, daß die Zersetzungsprodukte auf der Säule hängen bleiben oder nur sehr langsam eluiert werden.

Die Empfindlichkeit des Tests könnte besser sein. Andere in ätherischen Ölen vorkommende Stoffe zeigen größere Zersetzungen. So fand Farnow[17] bei Untersuchungen an künstlichen Gemischen u.a. Verluste bei Citral von 2 - 8 %, bei Limonen 0 - 33 %, bei Linalool 0 - 43 % und bei Geraniol 0 - 18 %. Als empfindlichere Testsubstanz wird von Bruhn[18] Linalylacetat verwendet.

Die Reproduzierbarkeit guter Testergebnisse und guter Trennsäulen kann bei der großen Zahl der z.T. unbekannten Einflußfaktoren nicht besser sein als die Reproduzierbarkeit gaschromatographischer Trennungen allgemein.

3.3.4 Linearität von Detektor und Registriereinrichtung

Für die quantitativen Arbeiten wurde nur der FID verwendet. Seine Empfindlichkeit ist mehr als ausreichend; in der Selektivität der Detektoranzeige bestehen für die verschiedenen Terpene keine allzugroßen Unterschiede.

Der lineare Bereich des FID reicht nach Angaben des Herstellers von der Nachweisgrenze ($5 \cdot 10^{-12}$ g Kohlenstoff/sec) bis zu Probenkonzentrationen von 5 - 10 % bei 1 µl Probevolumen. Die Linearität des Elektrometers wird ebenda mit $\pm$ 2 % angegeben. Da der elektronische Integrator sein Signal jedoch direkt vom Detektor empfängt, entfällt der letztgenannte Fehler, der mit dem Umschalten der Registrierempfindlichkeit verbunden ist.

Inwieweit der verwendete Detektor über den gesamten angegebenen Bereich wirklich 'linear' arbeitet, wurde nicht untersucht. Für Probemengen im Bereich von 0,5 bis 20 µg wurde Linearität der Peakflächen gefunden (Abb. 3-6). Im übrigen wurden bei den verschiedenen Auswertemethoden die Konzentrationen der Probelösungen so gewählt, daß Peaks mit möglichst gleichen Höhen verglichen wurden.

3.3.5 Das zum Ausmessen der Peakflächen gewählte Verfahren[56,83a]

Die Verfahren zum Ausmessen der Peakflächen unterscheiden sich bezüglich des Zeit- und Arbeitsaufwandes und in der erreichbaren Genauigkeit.

Bei den manuellen Methoden wird in der Regel vom fertigen Chromatogramm ausgegangen, und die Peakflächen werden durch Planimetrieren, durch Umzeichnen der Peaks mit geometrisch einfachen Formen, durch Ausmessen der Höhe und der Breiten in 15 % und 85 % der Höhe oder durch Ausschneiden und Wiegen ermittelt. Schneller lassen sich mit den Mengen korrelierbare Werte erhalten durch Messen der Peakhöhe, der Peakhöhe mal der Gesamtretentionszeit oder der Peakhöhe mal der Breite in halber Höhe; letztere läßt sich im allgemeinen am wenigsten genau messen.

Die bequemste und - bei vollständig getrennten Peaks - auch die richtigste Methode der Peakflächenmessung ist die elektronische Integration, die ohne das vom Schreiber aufgezeichnete Chromatogramm auskommt. Ihre Genauigkeit ist bei gut zu integrierenden Peaks vermutlich besser als die Genauigkeit der Probendosierung (s. 3.3.2). Um systematische Fehler zu vermeiden ist es jedoch notwendig - evtl. durch Handauswertung der Chromatogramme - zu kontrollieren, ob Anfang und Ende der Peaks richtig erkannt wurden. Bei fallender und wieder ansteigender Grundlinie kann es erforderlich werden, die Peakerkennung des Gerätes im Verlauf einer Trennung manuell zu verändern.

Bei den folgenden GC-Bestimmungen wurden die Peakflächen ausschließlich mit dem Integrator ausgewertet, auch wenn Trennungen beschrieben sind, bei denen eine Handauswertung richtigere Ergebnisse bringen könnte.

3.3.6 Umwandlung der Meßwerte in das Analysenergebnis[56,62,65,79)]

Zum Auswerten der erhaltenen Chromatogramme werden, je nach Analysenproblem und erforderlicher Genauigkeit, folgende Verfahren angewandt:

100 %-Methode
Zumischmethode
Auswertung mit internem Standard
absolute Eichung

a) 100 %-Methode (interne Normalisierung)

Die Peakfläche der zu bestimmenden Substanz wird mit der Gesamtfläche aller Peaks in Beziehung gesetzt. Größere Fehler entstehen, wenn nicht alle Komponenten der Probe verdampfbar oder gleich detektierbar sind. Für die ätherischen Öle, die zuvor nicht frisch destilliert wurden, bedeutet dies, daß sauerstoffhaltige Sesquiterpene und Zersetzungsprodukte, die auf der Säule zurückgehalten werden, unberücksichtigt bleiben, daß evtl. enthaltenes Wasser vom FID nicht angezeigt wird, und daß schließlich die elektrische Integration bei einer so großen Zahl von zum Teil unvollständig getrennter Komponenten mit Fehlern behaftet ist. Die Methode gibt gut wiederholbare Werte, kann aber, auch wenn für alle Inhaltsstoffe die Detektorempfindlichkeiten bekannt sind, für die ätherischen Öle nur Anhaltspunkte liefern.

Als erreichbare Genauigkeit werden in der Literatur angegeben 0,2 - 2 %[56] und 10 % relativ für WLD-Detektion[79].

b) Zumisch-Methode

Die Analyse wird mit und ohne Zusatz einer bekannten Menge der entsprechenden Reinsubstanz chromatographiert. Aus dem Vergleich der Peakflächen läßt sich die in der Analyse vorhandene Menge des gesuchten Stoffes berechnen. Korrekturfaktoren sind nicht erforderlich. Dosierfehler können durch Einbeziehen eines benachbarten Peaks herausdividiert werden. Voraussetzung ist, daß auch der Bezugspeak gut abgetrennt ist.

Genauigkeit der Methode: 1 - 2 %[56].

c) Auswertung mit internem Standard (innerer Standard, interne Standardisierung)

Der Analysenlösung werden in bekannter Menge eine bzw. mehrere Standardsubstanzen zugemischt. Aus den relativen Meßwerten werden mittels Eichfaktoren die gesuchten Konzentrationen errechnet. Diese Methode ist relativ genau und unabhängig von Dosierfehlern. Voraussetzung sind Standardsubstanzen, die den zu bestimmenden Komponenten bezüglich Verdampfbarkeit, chromatographischen Verhaltens und Detektorempfindlichkeit ähnlich sind. Häufig ist es schwierig, derartige Substanzen zu finden, besonders bei Vielkomponentengemischen mit nur wenigen freien Zonen im Chromatogramm.

Erreichbare Genauigkeit: ± 1 % relativ, für größere Genauigkeiten wären Mittelwerte aus mehreren Trennungen erforderlich[79].

d) Absolute Eichung (externe Standardisierung)

Die Meßwerte der zu bestimmenden Substanz werden mit getrennt ermittelten Eichfaktoren oder Eichkurven in Gewichtsprozent umgerechnet. Die Genauigkeit der Methode hängt in besonderem Maße vom Streuungsfehler der Probendosierung ab. Die Methode wird angewandt, wenn es nicht möglich ist, einen geeigneten internen Standard zu finden und die geforderte Präzision es zuläßt.

Erreichbare Genauigkeit: 0,2 - 2 %[56] und an anderer Stelle ± 2 %, relativ, bei größter Sorgfalt und mit mittelflüchtigen Proben, üblicherweise jedoch nur ± 5 bis 10 %, relativ[79].

3.4 Quantitative GC-Bestimmungen verschiedener Inhaltsstoffe im Einzelöl und im Gemisch der Öle

In den Abbildungen 3-1 und 3-2 wurden die Trennungen der 4 ätherischen Öle gezeigt, wie sie auf einer gepackten PEG-20000-Säule mittlerer Länge bei programmierter Temperatur erhalten

wurden. Eine möglichst vollständige Auflösung - die Voraussetzung für eine richtige und genaue quantitative Bestimmung - ist im Gemisch aller vier Öle nur für wenige Peaks gegeben. Die meisten der in den einzelnen Ölen noch vollständig abgetrennten Peaks fallen im Gemisch aller Öle mehr oder weniger mit Peaks der anderen Öle zusammen. Je nach dem Grad der Überlappung, der Art der Integration und der Auswerte-Methode entstehen daraus unterschiedlich große Fehler.

Es wurde versucht, mit möglichst einem Säulenfüllmaterial auszukommen, und durch Änderung der Säulentemperatur, der Säulenlänge und u.U. der Trägergasgeschwindigkeit die jeweils günstigsten Analysenbedingungen zu finden. Durch Wechsel der stationären Phase wäre es zwar möglich, die eine oder andere Komponente im Gemisch der Öle besser abzutrennen und damit eine richtigere und schnellere Bestimmung jener Komponente zu erreichen, doch ist das Erproben mehrerer Systeme bei den kleinen Probenzahlen mit einem relativ großen Zeitaufwand verbunden und schließlich war es auch die Absicht bei den mehr beispielhaften GC-Untersuchungen zu zeigen, wie schlechte Werte bei mehr oder weniger unaufgelösten Peaks erhalten werden. Auch auf die Vereinfachung des Analysengemisches beispielsweise durch Vortrennung auf einer Kieselgel-Säule wurde verzichtet. (Durch LC wäre mit einfachen Mitteln eine Trennung der Kohlenwasserstoffe von den sauerstoffhaltigen Terpenen möglich, auch eine LC-Abtrennung der Ester oder der Alkohole von den übrigen Bestandteilen dürfte keinen allzu großen Aufwand erfordern.)

Für die folgenden quantitativen Bestimmungen wird davon ausgegangen, daß die verwendeten Peakflächen von nur einer Substanz herrühren. Den auf diese Weise hergeleiteten Aussagen über die Genauigkeit der Methode tut dies keinen Abbruch. Auch für die Wiederfindung eines Peaks des reinen Öls im Gemisch aller Öle entsteht daraus kein Fehler, so lange die chromatographischen Bedingungen nicht derart geändert werden, daß sich im Peak eventuell enthaltene Bestandteile desselben Öles teilweise oder vollständig abtrennen.

Ähnliches gilt für die Vergleichssubstanzen, die nur z.T. in etwa 99 proz. Reinheit erhalten werden konnten. Solange eine der Verunreinigungen nicht zu der Fläche eines anderen zu bestimmenden Peaks des Chromatogramms addiert wird, können Fehler ausgeschaltet werden. In Frage zu stellen ist jedoch die Richtigkeit einer Analyse, wenn Peaks, deren Einheitlichkeit nicht bewiesen wurde, der Gehaltsbestimmung eines Inhaltsstoffes zugrunde gelegt werden. Beim Vergleich verschiedener chromatographischer Methoden, wie GC und LC, könnten dann abweichende Gehalte für denselben Inhaltsstoff gefunden werden. Aufgrund der anderen Detektion in der LC (UV) war es jedoch selten möglich, ein ätherisches Öl anhand derselben Substanz mit beiden Methoden zu bestimmen. Ein allgemeiner Vergleich der quantitativen Möglichkeiten der beiden chromatographischen Methoden (GC und LC) bei der Bestimmung ätherischer Ölgemische muß sich ohnehin auf einen Vergleich der Genauigkeiten beschränken.

3.4.1 Bestimmung des Geraniols im Melissenöl (mit verschiedenen Auswerte-Methoden)

Am Beispiel des Geraniols, der zuletzt eluierten, größeren Komponente des Melissenöls soll gezeigt werden, mit welcher Richtigkeit und Genauigkeit die Bestimmung einer praktisch vollständig abgetrennten Komponente mittlerer Größe mit den verschiedenen Auswertemethoden (s.o.) möglich ist. Die Bestimmung des Geraniols bietet sich auch insofern an, als eine Trennung unter isothermen Bedingungen mit relativ kurzen Säulen und bei vernünftigen Analysenzeiten möglich ist. Da die Trennung durch Komponenten der anderen drei Öle nicht beeinträchtigt wird, läßt sich über die Bestimmung des Geraniols auch die Menge eines Melissenöls mit bekanntem Geraniolgehalt im Gemisch der vier Öle ermitteln. Allerdings können unter isothermen Bedingungen Komponenten, die später als Geraniol eluiert werden, die Integration der nachfolgenden Analyse beeinflussen. Der Anteil dieser Stoffe ist in den anderen ätheri-

schen Ölen teilweise größer als im Melissenöl (Abb. 3-8). Schließlich zeigt sich schon am Beispiel der Geraniolbestimmung, daß es notwendig ist, die zersetzenden Eigenschaften der Säule zu kontrollieren. Geraniol gehört zwar nicht zu den empfindlichsten Terpenalkoholen, doch ist Dehydratisierung und Cyclisierung mit wasserentziehenden Mitteln möglich[1)]. Bei der GC des Geraniols fand Farnow Zersetzungen zwischen 0 - 18 %[17)], während der eigenen Arbeiten wurde bei der Gehaltsbestimmung des reinen Geraniols auf einer nicht mehr einwandfreien PEG-Säule schwer reproduzierbare Elutionskurven vor dem Erscheinen des Geraniolpeaks gefunden, - ein Hinweis für Zersetzungen auf der Säule. Auf der im folgenden benutzten Säule wurden diese nicht mehr beobachtet.

a) Bestimmung des Geraniols im Melissenöl mit der 100-%-Methode

Hierbei wurde sowohl mit verdünnten Probelösungen (ca. 2 %, entsprechend 30 µg Probemenge) gearbeitet, um Überladung der Säule oder des Detektors auszuschließen, als auch mit unverdünntem öl (1,5 mg Probemenge), um sicherzustellen, daß nur vernachlässigbar kleine Peaks durch den Lösungsmittelpeak verdeckt werden. Eine Bestimmung aller Komponenten des Melissenöls ist nur bei programmierter Temperatur möglich.

Die Fläche des Geraniol-Peaks betrug bei 2 Messungen 7,4 % der Summe aller Peakflächen (auf Säule D in Tab. 3-5).

b) Bestimmung des Geraniols im Melissenöl mit der Zumisch-Methode

Abb. 3-5 zeigt je eines der mit und ohne Geraniol-Zuwaage erhaltenen Chromatogramme des Melissenöls.

Der Geraniol-Gehalt im Melissenöl errechnet sich nach folgender Gleichung. (Ähnliche Gleichungen finden sich in der GC-Literatur, z.B. bei Kaiser[56)].)

$$\text{Gew\%}_G = \frac{E_G \cdot \%_G}{E_M} \cdot \frac{\text{rel } F_M}{\text{rel } F_{M+G} - \text{rel } F_M} \qquad (1)$$

$$= \frac{0{,}082 \text{ g} \cdot 98{,}7}{1{,}735 \text{ g}} \cdot \frac{1{,}1273}{1{,}8406 - 1{,}1273} = \underline{\underline{7{,}37 \%}}$$

(E = Einwaage, F = Peakfläche, M = Melissenöl, G = Geraniol, $\%_G$ = Reinheitsgehalt des Geraniol in %)

Für die Berechnung wurden die Mittelwerte aus je drei Analysen zugrunde gelegt; die relativen Standardabweichungen für die relativen Peakflächen betrugen ± 0,07 bzw. ± 0,2 %. Der erhaltene Wert wurde auf 7,4 % gerundet, da einmal die Peakflächen-Bestimmung, zum anderen die Einwaage von 82 mg eines doch etwas flüchtigen Stoffes nicht so genau sein dürften.

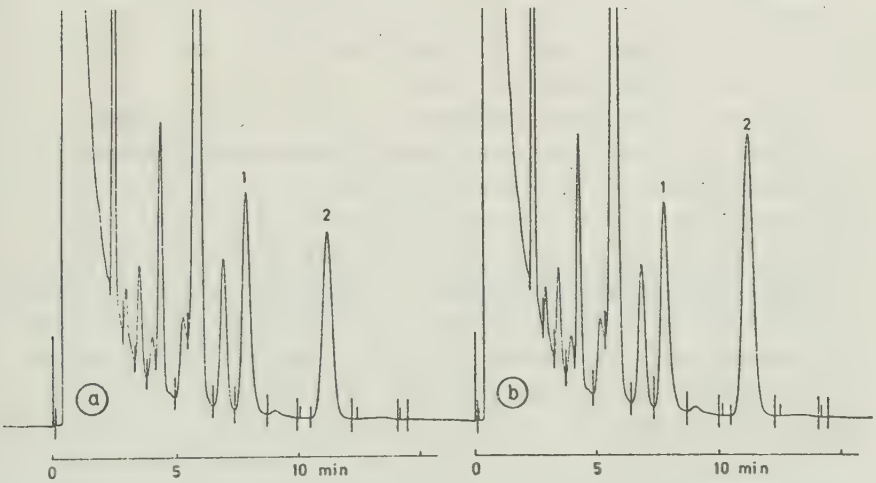


Abb. 3-5: a) 1,5 µl einer 2 proz. Melissenöl-Lösung in Heptan,
b) 1,5 µl einer 2 proz. Melissenöl-Lösung + 0,1 % Geraniol in Heptan;
Säule wie in Abb. 3-4 (= Säule E in Tab. 3-5); Inj. (Glas) 250°C, Säule 130° und Det. 250°C; 10 ml N_2/min (entsprechend u_{lin} = ca 10 cm/sec).
1 = Bezugspeak, 2 = Geraniolpeak

c) Bestimmung des Geraniols im Melissenöl mit internem Standard

Wie oben erwähnt, ist es schwierig, besonders bei Vielkomponentengemischen, interne Standards zu finden, die möglichst nahe bei der oder den zu bestimmenden Verbindungen eluiert werden. Für die Bestimmung des Geraniols konnte nur 1-Dodecanol gefunden werden. (Undecanol wäre nur schwer von Geraniol abzutrennen, ungesättigte Undecanole waren nicht erhältlich.) Dodecanol erfüllt bei den gewählten Bedingungen (5 % PEG 20000, Säule E in Tab. 3-7, 140° C Säulentemperatur) allerdings nicht alle Forderungen, die an eine ideale interne-Standard-Substanz gestellt werden:

- Es besitzt einen relativ hohen Siedepunkt (257° C), so daß die Injektor-Temperatur eine Stufe - von 250 auf 300° C - erhöht werden müßte. Dies wäre jedoch den empfindlicheren Terpenen und der Lebensdauer der Silicongummi-Dichtungen abträglich.
- Es wird nicht mehr sehr nahe beim Geraniol eluiert: Retention, relativ zu Geraniol: 1,72.
- Es zeigt ein wenn auch geringes Tailing an der Peakbasis (s. Abb. 3-7), welches eine genaue Integration erschwert.
- Es zeigt schon bei geringen Probemengen (größer 2 µg) eine asymmetrische Peakform (fronting) und neigt eher zu Überladungserscheinungen als Geraniol: Die Retentionszeiten beginnen bereits bei 1 µg Dodecanol, aber erst bei 6 µg Geraniol zuzunehmen, d.h. die Peakhöhen des Dodecanols nehmen mit der Probemenge relativ stärker ab als die des Geraniols, so daß eine Auswertung nach der Peakhöhe allenfalls durch Eichkurven zulässig wäre.

Dagegen wurde eine gute Korrelation zwischen Peakfläche und Probemenge für Geraniol und für Dodecanol gefunden: Die graphische Auswertung der Mittelwerte aus je drei Messungen für 6 verschiedene Probemengen zwischen 1,4 - 28 µg Dodecanol und zwischen 0,6 - 12 µg Geraniol (entsprechend 0,6 bis 12 % Lösungen des untersuchten Melissenöls bei 1,5 µl Probevolumen) ergab zwei zusammenfallende Geraden (Abb. 3-6). Die über die

Regressionsgleichung berechneten Geraden zeigten keinen signifikanten Unterschied: für Geraniol y = 4,581 x - 0,005, für Dodecanol y = 4,626 x + 0,010.

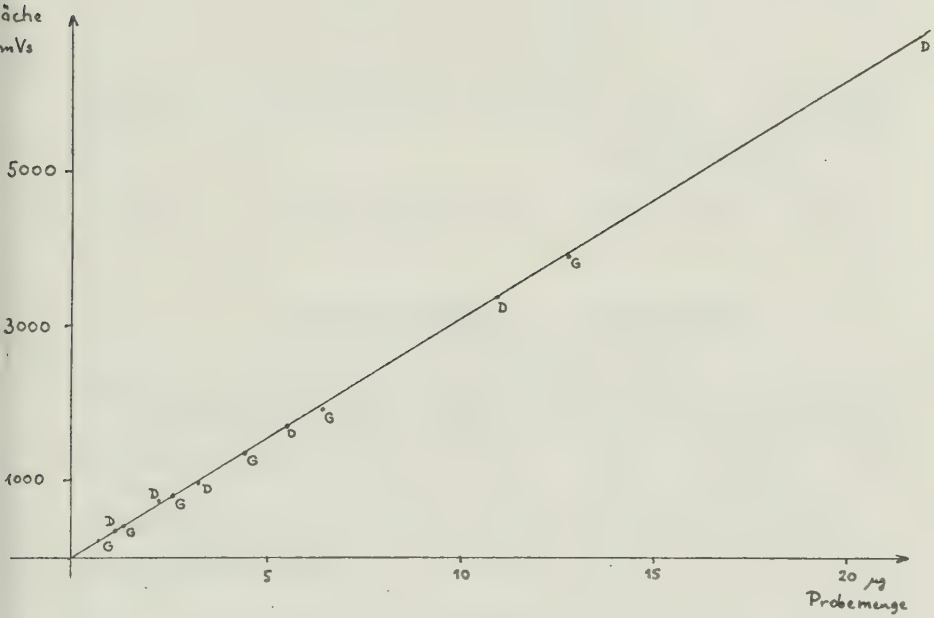


Abb. 3-6: Linearität des FID für den bei den Geraniol-Bestimmungen verwendeten Probenmengen-Bereich; Peakflächenwerte (mVs) von Geraniol (G) und Dodecanol (D), aufgetragen gegen die Probenmenge (µg).

Da also für den untersuchten Konzentrationsbereich Linearität gegeben ist, braucht für die Umwandlung der Peakflächen in Analysenwerte anstelle einer Eichkurve nur ein Eichfaktor verwendet zu werden. Für dessen Berechnung wurde der Mittelwert der Peakflächenverhältnisse (Geraniol = 1) mit dem Verhältnis der Einwaagen verglichen:

$$\frac{\text{Peakfläche D} \cdot f}{\text{Peakfläche G}} = \frac{\text{Einwaage D} \cdot \%\text{-Gehalt D}}{\text{Einwaage G} \cdot \%\text{-Gehalt G}} \qquad (2)$$

$$\frac{1{,}764 \cdot f}{1} = \frac{1{,}467\ \text{g} \cdot 100}{0{,}850\ \text{g} \cdot 98{,}7}$$

$$f = 0{,}991$$

(D = Dodecanol, G = Geraniol, f = Eichfaktor)

Dies bedeutet, daß die Peakfläche des Dodecanols um etwa 1 % größer ist als bei gleichen Detektorempfindlichkeiten beider Stoffe zu erwarten wäre.

Der Gehalt des Geraniols im Melissenöl berechnet sich dann wie folgt (M = Melissenöl):

$$\%\ G = \frac{\text{Peakfläche G} \quad \text{Einwwage D} \cdot 100}{\text{Peakfläche D} \cdot f \cdot \text{Einwaage M}} \qquad (3)$$

Je nach Menge des zugewogenen internen Standards wurden unterschiedliche Geraniolgehalte gefunden: Für eine Lösung mit 0,205 g Dodecanol neben 2,221 g Melissenöl (s. Abb. 3-7) betrug der Geraniol-Gehalt 7,65 % ($s = \pm 0{,}02$ %, n = 4), bei einer anderen Lösung mit einer relativ größeren Menge an Dodecanol (0,154 g + 1,083 g Melissenöl lag der Gehalt bei 7,47 % ($s_{rel} = \pm 0{,}25$ %, n = 4).

Zur Richtigkeit dieser Methode im Vergleich mit den anderen Auswertemethoden sei erwähnt:
Während bei der Zumisch-Methode die Frontschulter des Geraniols getrennt integriert wurde (Abb. 4-5), wird sie jetzt, bei den kürzeren Retentionszeiten, dem Geraniol zugeschlagen. Ihr Anteil an der Peakfläche des Geraniols ist jedoch kleiner 0,2 % oder 0,015 % des Gesamtöls, - dieser Fehler scheint vernachlässigbar. Ein größerer Fehler ist möglich durch einen kleinen Peak des Melissenöls mit ähnlicher Retentionszeit wie Dodecanol, der sich zur Peakfläche des Dodecanols addiert. Bei einer Einwaage von 0,205 g Dodecanol neben 2,221 g Melissenöl beträgt der Anteil jener Fläche am Dodecanol 0,5 %. Daraus resultiert ein 0,035 % kleinerer Geraniolgehalt.

Größere Geraniolgehalte werden gefunden, wenn es nicht gelingt, den internen-Standard-Peak vollständig zu integrieren: Teilweise wurde durch eine vor dem Dodecanol eluierte, nicht vollständig abgetrennte Melissenöl-Komponente vom Integrator eine erhöhte Grundlinie erkannt, so daß der Dodecanol-Peak tangential integriert wurde; - Abhilfe wäre nur möglich durch zeitweise manuellen Betrieb des Integrators. Zum anderen erwies es sich als schwierig, das Tailing des Dodecanol-Peaks richtig zu erfassen, da durch spät eluierte Komponenten der vorhergehenden Analysen keine gleichbleibende Grundlinie erhalten wird und damit der Integrationsstop über die Neigungsempfindlichkeit schlecht reproduzierbar wird. Beide Integratorfehler führen zu kleineren Dodecanol-Flächen, also größeren Geraniol-Gehalten und zu streuenden Werten.

Durch relativ größere Zuwaagen von Dodecanol zum Melissenöl werden die genannten Integrationsfehler kleiner, d.h. richtigere Dodecanol-Flächen führen zu kleineren Geraniol-Gehalten, so daß der oben gefundene kleinere Geraniolwert von 7,47 % richtiger sein dürfte.

d) Bestimmung des Geraniols im Melissenöl mit externem Standard

In Abb. 3-6 war gezeigt worden, daß die Peakflächen linear mit den Probemengen zunehmen. Es genügt daher, die Peakfläche des Geraniols im Melissenöl mit dem Meßwert des gleichen Probevolumens einer ähnlich konzentrierten Eichlösung zu vergleichen.

Der Gehalt errechnet sich nach der Gleichung (G = Geraniol, M = Melissenöl, V = Vergleich):

$$\% \, G = \frac{\text{Fläche G in M} \cdot \text{Einwaage V} \cdot \%\text{-Gehalt G}}{\text{Fläche G in V} \cdot \text{Einwaage M}} \qquad (4)$$

$$= \frac{634 \text{ mVs} \cdot 0{,}170 \text{ g} \cdot 98{,}7}{686 \text{ mVs} \cdot 2{,}103 \text{ g}} = 7{,}37 \, \%$$

Die relative Streuung der Peakflächen betrug $\pm$ 2,4 % (n = 6) bzw. 4,1 % (n = 7).

Die chromatographischen Bedingungen sind die gleichen wie bei der internen Standardisierung. Es wird also auch hier die Frontschulter des Geraniols dem Geraniol-Peak zugeschlagen (Abb. 3-7a) doch ist dieser Fehler vernachlässigbar klein, verglichen mit dem Streuungsfehler der Probendosierung oder Fehlern durch Nichtkonstanz der Detektoranzeige.

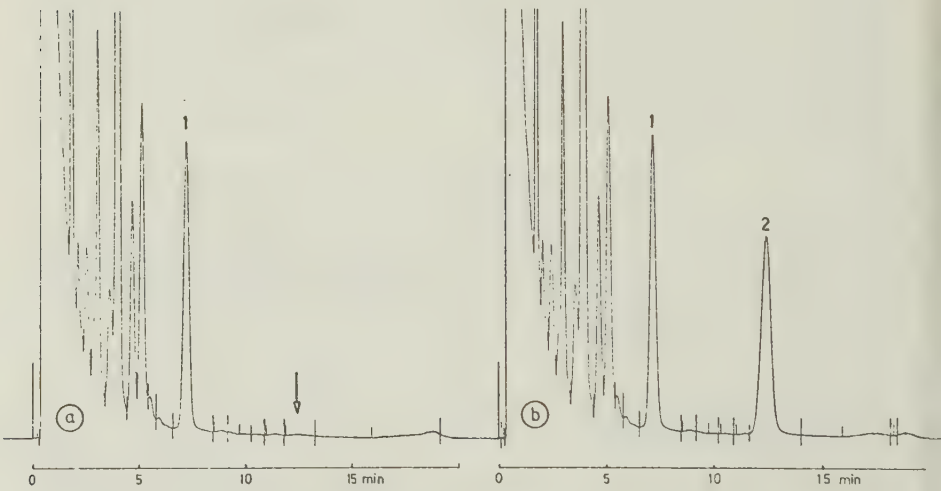


Abb. 3-7: a) 1,5 µl einer 2 proz. Melissenöl-Lösung in Heptan,
b) 1,5 µl einer Lösung mit 2 % Melissenöl + 0,2 % n-Dodecanol in Heptan
Säule wie in Abb. 3-5 (= Säule E in Tab. 3-5); gc Bedingungen wie in Abb. 3-5, aber Säulentemperatur jetzt 140°C;
1 = Geraniol, 2 = n-Dodecanol

Diskussion der vier Auswerte-Methoden

a) Arbeitsaufwand

100-%-Methode:

Da sie gut wiederholbare Werte liefert, genügen ein oder zwei Werte pro Analyse. Auch für die Herstellung der Probelösungen ist keine besondere Sorgfalt erforderlich. Allerdings erwies es sich als mühsam, das Temperaturprogramm und die Integratoreinstellung herauszufinden, die für möglichst alle Peaks eine maximale Auflösung und eine möglichst richtige Integration erlauben.

Zumisch-Methode:

Sie erfordert, wenn - wie im vorliegenden Fall - nur ein Stoff bestimmt wird, nur je eine Trennung mit und ohne Zuwaage. Genaue Volumina bei der Bereitung der Lösungen sind nicht erforderlich, nur die beiden Einwaagen für die Lösung mit zugemischter Komponente müssen genau sein. Der Arbeitsaufwand ist also bei der Bestimmung von nur einer Komponente nicht größer als bei der internen Standardisierung; er nimmt jedoch schnell zu, wenn mehr als ein Inhaltsstoff bestimmt werden soll.

Interne Standardisierung:

Vorausgesetzt, daß der zu bestimmende Peak und der interne-Standard-Peak gut integrierbar sind und Eichfaktoren vorliegen, genügt für befriedigend genaue Werte eine Trennung pro Analyse. Für die Bereitung der Lösungen sind je zwei genaue Einwaagen (Öl + Standard) aber keine genauen Volumina erforderlich.

Externe Standardisierung:

Für die Analysen- und für die Vergleichslösung muß die Konzentration genau sein, also je eine genaue Einwaage auf ein definiertes Volumen. Wegen der relativ großen Streuung der Probenaufgabe ist es notwendig, beide Lösungen wiederholt zu dosieren, um vertrauenswürdige Werte zu erhalten. Damit erhöht sich die Zeit, die der Chromatograph pro Analyse belegt ist.

b) Richtigkeit und Präzision der erhaltenen Werte

Bei allen vier Auswerte-Methoden war meist mit nur einer Analysenlösung gearbeitet worden. Wägefehler und Volumenfehler bei der Herstellung der Lösungen schienen vernachlässigbar. Der Fehler der Probendosierung wurde durch Mitteln mehrerer Werte klein gehalten. Für den Geraniol-Gehalt im Melissenöl wurden folgende Werte und relative Standardabweichungen gefunden:

100-%-Methode	7,4 %	(Meßwert-%)	($s_{rel} = \pm 0,0$ %, n = 2)
Zumisch-Methode	7,4 %	(G/G)	($s_{rel} = \pm 0,2$ %, n = 3)
interner Standard	7,5 %	(G/G)	($s_{rel} = \pm 0,25$ %, n = 4)
externer Standard	7,4 %	(G/G)	($s_{rel} = \pm 2,4$ %, n = 6)

Die Übereinstimmung der Werte war besser als erwartet. Vor allem bei der 100-%-Methode, die als wenig genau gilt, war mit abweichenden Werten gerechnet worden. Es könnten sich jedoch mehrere Fehler ausgeglichen haben. So führen z.B. unvollständige Integration oder Nichterfassung schwerflüchtiger oder nichtdetektierbarer Verbindungen zu größeren Geraniolgehalten, während die Kohlenwasserstoffe, die relativ stärker vom FID angezeigt werden, zu geringe Meßwert-Prozente für Geraniol ergeben.

Die etwas höheren Werte bei der internen Standardisierung dürften, wie erwähnt, auf Schwierigkeiten bei der Integration des Dodecanol-Peaks zurückzuführen sein, zumal bei Auswertung der Geraniol-Peaks derselben Chromatogramme durch externe Standardisierung ebenfalls Werte um 7,4 % gefunden wurden.

Für die weiteren Untersuchungen erscheint es günstiger, nicht mit internem Standard zu arbeiten, zumal es im Gemisch aller Öle noch schwieriger sein wird, Dodecanol richtig zu integrieren. Da die bei ungenügender Integration des internen Standards verursachten Fehler nicht nur Streuungsfehler, sondern vor allem systematische sind, dürfte die externe Standardisierung die geeignetere Methode sein. Die bisher gefundenen relativ großen Streuungen bei der Probenaufgabe lassen sich verringern durch Verwendung größerer Probevolumina ($\geq$ 2 µl). Die

Zumisch-Methode kann je nach Analysenproblem einen größeren Aufwand bei der Probenvorbereitung bedeuten. Die 100-%-Methode ist wegen der Schwierigkeiten, alle Stoffe zu erfassen und richtig zu integrieren, für genaue Analysen abzulehnen.

3.4.2 Bestimmung des Melissenöls im Gemisch der Öle anhand des Geraniols

Es wurde versucht, bei der Bestimmung des Geraniols im Gemisch der Öle mit derselben Säulenlänge auszukommen, wie bei der Bestimmung des Geraniol-Gehaltes des Melissenöls. Auch schienen wie dort für kurze Analysenzeiten isotherme Bedingungen geeigneter.

Bei den qualitativen Untersuchungen war gezeigt worden, daß sich Geraniol gut von den Inhaltsstoffen der anderen Öle bei langsamem Temperaturprogramm abtrennen läßt (Abb. 3-1). Bei isothermen Bedingungen erwies es sich jedoch als schwierig, die in Abb. 3-1 nahe dem Geraniol erscheinende Komponente des Pinusöls getrennt zu eluieren. Es handelt sich bei jener um einen Kohlenwasserstoff - sie läßt sich auf Kieselgel mit Petroläther eluieren; aufgrund der GC-Retentionszeit ist ein Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff zu vermuten.

Frühere Versuche hatten gezeigt, daß die relative Retention der beiden Stoffe, Geraniol und die bezeichnete Pinusöl-Komponente, von Säule zu Säule je nach Konditionierung und Alter der Säulenfüllung verschieden war. Auch war die Trennung der beiden Stoffe deutlich abhängig von der Säulentemperatur: Bei tieferen Temperaturen (120° C) und dem früher benutzten Temperaturprogramm (Abb. 3-1) wird die Pinusöl-Komponente vor dem Geraniol, bei höheren Temperaturen (160° C) wird sie nach dem Geraniol eluiert; bei 130 und 140° C wurde nur ein Peak für das Gemisch der beiden Stoffe erhalten.

Für die folgende Bestimmung erschien die höhere Säulentemperatur (160° C) geeigneter. Die damit verbundenen relativ kurzen Analysenzeiten erlauben, die nach dem Geraniol erscheinenden Stoffe abzuwarten. Deren Anteil ist in den anderen Ölen teilweise größer als im Melissenöl (Abb. 3-8). Bei vorzeitiger Probenaufgabe der nächsten Analyse würden diese Stoffe zu Integrationsfehlern durch falsche Peakerkennung und unrichtiges Anlegen der Basislinie führen. Bei so kurzen Retentionszeiten wird allerdings Geraniol trotz guter Selektivität des chromatographischen Systems nicht vollständig von den Komponenten der anderen Öle abgetrennt. Auch sitzt der Geraniol-Peak noch auf dem Tailing des Lösungsmittel-Peaks (Abb. 3-8). Beide Tatsachen erschweren eine richtige automatische Integration.

So mögen die folgenden Analysen ein Beispiel geben, in welchem Maße Fehler bei unvollständiger Auflösung, bei automatisch schwierig zu integrierenden Peaks und bei wechselnder Zusammensetzung des Gemisches der 4 Öle entstehen.

Für die Auswertung der Chromatogramme wurde die Methode der externen Standardisierung gewählt. Die anderen Auswerte-Methoden erschienen nicht geeignet: a) Bei der Zumisch-Methode fehlt eine Bezugspeakfläche; - außer Geraniol werden alle Stoffe des Melissenöls im Gemisch der Öle von anderen Stoffen überlagert. b) Bei der internen Standardisierung ist die Integration des Dodecanols mehr gestört als die des Geraniols. - Es sind dadurch nicht nur stärker streuende, sondern auch systematisch falsche Werte zu erwarten (s.o.).

Die bei der externen Standardisierung zur Verringerung des Dosierfehlers notwendige wiederholte Probenaufgabe scheint bei einer Analysenzeit von 30 min für dreimalige Dosierung je Probe noch tragbar. Bei geringeren Ansprüchen an die Genauigkeit könnte auch eine einzige Probenaufgabe genügen, zumal die Flächenwerte (für den externen Standard) eine relative Standardabweichung von nur $\pm$ 0,8 % (n = 15) aufwiesen - bei einem Probevolumen von 2 µl.

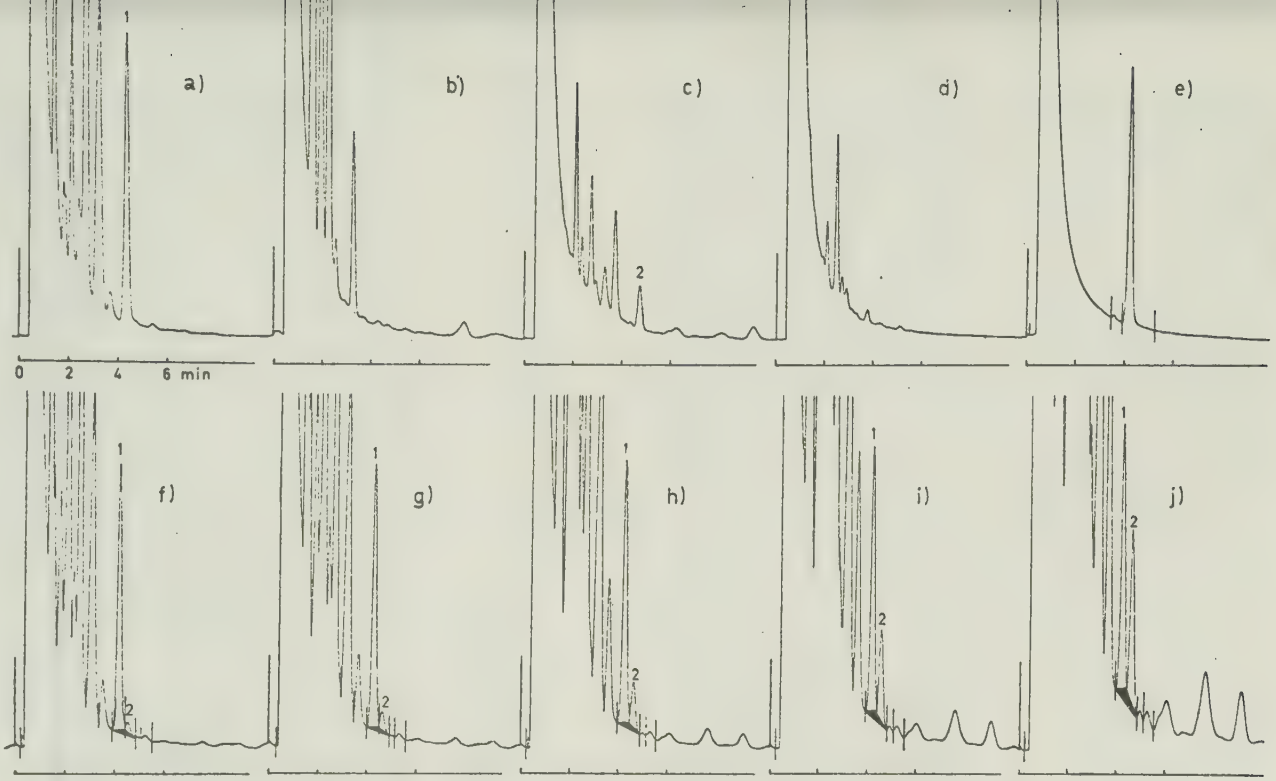


Abb. 3-8: Chromatogramme, die bei der Bestimmung des Melissenöls in Ölgemischen erhalten wurden. Probenvolumen je 2 µl, a) Melissenöl, b) Menthaöl, c) Pinusöl, d) Eucalyptusöl zu 1 % in Heptan, e) Geraniol 0,07 %, f - i) Melissenöl 0,8 % + die anderen drei Öle zu je f) 0,1 %, g) 0,2 %, h) 0,6 %, i) 1,2 %, j) 2,5%; Säule E der Tab. 3-5, 160°C Säulentemperatur, 7,5 ml N_2/min; 1 = Geraniol, 2 = Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff des Pinusöls.

Um zu vermeiden, daß Fehler eventuell durch unterschiedlich große Peakflächen des Geraniols in der Analyse und im externen Standard entstehen, wurde die Konzentration des Melissenöls in den hergestellten Ölgemischen konstant gehalten und nur die Konzentration der anderen Öle verändert. Auftretende Fehler dürften damit allein auf die Integration zurückzuführen sein: Dem verwendeten Integrator ist es bei den erhaltenen Chromatogrammen nicht möglich, anders zu integrieren als in Abb. 3-8, f-k wiedergegeben. Richtig wäre eine gemeinsame, abfallende Basislinie für Geraniol und die Pinusöl-Komponente. Beim Geraniol-Peak legt der Integrator jedoch die Basislinie waagerecht, so daß ein Stück der Peakfläche unberücksichtigt bleibt. Bei der Pinusöl-Komponente erfolgt die Integration zwar tangential, doch liegt der Anfang der Basislinie zu hoch. Beide Fehler verursachen zu kleine Peakflächen. Für die Ölgemische bedeutet dies, daß mit steigendem Gehalt der anderen Öle weniger Melissenöl im Gemisch gefunden wird. Bei der in geringerer Konzentration vorkommenden Pinusöl-Komponente ist der relative Fehler größer und nimmt mit zunehmender Konzentration des Pinusöls im Gemisch ab.

In Abb. 3-9 sind die gefundenen Peakflächen des Geraniols und der Pinusöl-Komponente gegen die Konzentration der Öle in der Probelösung aufgetragen.

In Zahlen ausgedrückt: Bei einer jeweils etwa 0,0-; 0,1-; 0,2-; 0,6-; 1,2- und 2,5-fachen Konzentration der übrigen Öle neben Melissenöl (= 1) beträgt die Wiederfindungsrate für Melissenöl 100,0; 98,1; 96,5; 96,0; 94,5 und 93,9 %. Bei der Pinusöl-Komponente sollten sich die Peakflächen aufgrund der hergestellten Konzentrationen wie 0 : 1 : 2 : 5 : 10 : 20 verhalten; gefunden wurden jedoch Verhältnisse von 0,0 : 0,6 : 1,5 : 4,6 : 9,7 : 20,0.

Richtigere Werte dürften bei den beschriebenen Trennbedingungen durch manuelle Flächenbestimmung erhalten werden, z.B. über das Produkt aus Peakhöhe mal Retentionszeit. Sinnvoll erscheint

auch der Versuch, mit größeren Probenkonzentrationen zu arbeiten, da dadurch der Lösungsmittel-Peak relativ kleiner erscheint, so daß die Differenz der Integratorflächenwerte zwischen tangential und waagerecht angelegter Basislinie kleiner wird (Abb. 3-8). Der beste Weg, richtigere und genaue Werte zu erhalten, dürfte jedoch in der automatischen Integration von Trennungen liegen, die mit einer entsprechend längeren Säule bei gleicher Selektivität erhalten werden.

Bei vollständiger Auflösung und richtiger Integration dürfte der Fehler kaum größer als bei der Bestimmung des Geraniol-Gehalts des Melissenöls sein. Aus der für den externen Standard gefundenen relativen Standardabweichung ($\pm$ 0,8 %, n = 15) berechnete sich für Mittelwerte aus je drei Messungen pro Probe ein Vertrauensbereich von $\pm$ 0,98 %*). Die Wiederfindungsrate für Melissenöl im Gemisch würde also zwischen 99 und 101 % liegen, - bei vollständig abgetrenntem Geraniol, bei 2 µl Probevolumen bei externer Standardisierung mit Mittelwerten aus je drei Trennungen.

---

*) Der Vertrauensbereich wurde nach folgender Gleichung berechnet[74]:

$$q = s \cdot t(95,n)/\sqrt{n}$$

(s = Näherungsstandardabweichung, t(95,n) = statistischer Faktor = 2,13 für n = 15, n = Zahl der Einzelmessungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde = 3).

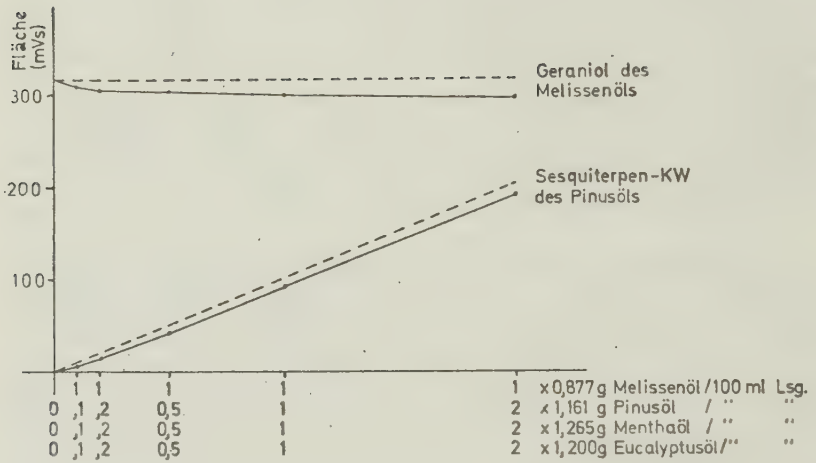


Abb. 3-9: Peakflächen des Geraniols und der Pinusöl-Komponente, aufgetragen gegen die Konzentration der Öle;
——— gefundene Werte
----- bei richtiger Integration zu erwartende Werte.

3.4.3 Bestimmung des Menthols im Mentha-Öl

Menthol kann als stabiles Terpen angesehen werden, so daß Fehler durch Zersetzungen auszuschließen sind. Mit der gewählten Säulenfüllung (5 % PEG 20000) sind allerdings keine idealen Peakformen für Menthol zu erhalten: Der Menthol-Peak zeigt Fronting, d.h., mit steigender Probenmenge wird die Abtrennung der vor dem Menthol erscheinenden Komponente schlechter, die Retentionszeiten nehmen zu und die Peakhöhen nehmen ab. - Eine Auswertung über die Peakhöhe wäre also nur mittels Eichkurve möglich (s. Geraniol Bestimmung mit Dodecanol als internem Standard).

Für die Bestimmung des Menthols im Menthaöl schien die Zumisch-Methode geeignet, auch wenn der Bezugspeak (Menthon) nicht sehr nahe beim Menthol eluiert wird (Abb. 3-10). Ein kleiner unvollständig abgetrennter Peak vor dem Menthol läßt sich getrennt integrieren und stört die Richtigkeit der Bestimmung wenig. Die Streuung der Werte war gering: Bei je zwei Trennungen wurden Differenzen der Peakflächenverhältnisse von 0,04 % bzw. 0,1 % gefunden.

Der Gehalt wurde wie bei der Geraniol-Bestimmung berechnet (nach Gleichung 1). Bei einer Zuwaage von 0,2090 g Menthol, 99,4 %, zu 0,9567 g Menthaöl wurde ein Gehalt von 30,1 % (G/G) Menthol im Menthaöl gefunden.

Die Fläche des Menthon-Peaks beträgt das 0,860-fache der Mentholfläche. Gleiche Detektorempfindlichkeiten der beiden Stoffe und Einheitlichkeit des Menthon-Peaks vorausgesetzt, ergibt sich ein Menthon-Gehalt des Menthaöls von 25,9 %.

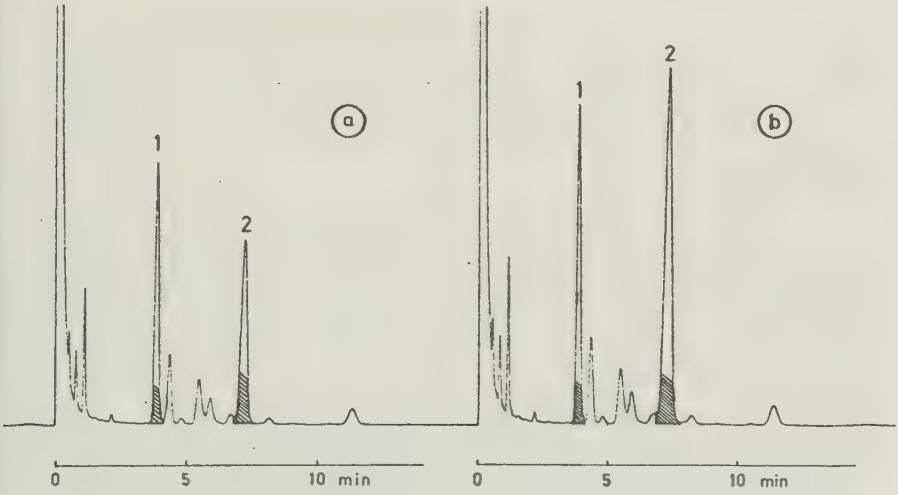


Abb. 3-10: Bestimmung des Menthols im Menthaöl mit der Zumischmethode,
a) 2 µl Menthaöl, 2 proz. in Heptan,
b) 2 µl Menthaöl, 2 proz., + Menthol, 0,4 proz., in Heptan,
Säule D in Tab. 3-5, Säulentemperatur 140°C, Inj. und Det. 250°C, 10 ml N_2/min
1 = Bezugspeak, Menthon, 2 = Menthol

3.4.4 Bestimmung des Menthaöls im Gemisch der Öle

Abb. 3-11 gibt (a) das Chromatogramm einer Mischung aller 4 Öle und (b) einer Mischung aus Eucalyptus-, Pinus- und Melissenöl in etwa gleicher Konzentration bei konstanter Säulentemperatur wieder. (Ein Chromatogramm des Menthaöls - bei 10° C höherer Säulentemperatur war in Abb. 3-10 gezeigt worden.) Praktisch alle Peaks des Menthaöls werden mehr oder weniger von Peaks der anderen drei Öle überlagert. Am wenigsten dürfte die Bestimmung des Menthaöls im Gemisch aller Öle anhand der kleineren, nach dem Menthon eluierten Komponente gestört sein (Peak 1 in Abb. 3-11a). Diese liegt im Menthaöl zu etwa 7 % vor.

Eine Bestimmung von Menthaöl anhand des Piperitons wäre möglich, wenn Pinusöl im Gemisch abwesend ist (Abb. 3-2). Eventuell ließe sich Piperiton auch auf einer anderen stationären Phase besser abtrennen, z.B. auf QF-1, OV 210 oder FFAP, welche Carbonylverbindungen stärker zurückzuhalten vermögen.

Eine Bestimmung anhand der Hauptkomponente Menthol ist nicht neben Melissenöl möglich. Auch bei tieferen Säulentemperaturen gelang es nicht, die als Frontschulter des Menthols erscheinende Melissenöl-Komponente (s.a. Abb. 3-2) ausreichend abzutrennen.

Um Frontschulter und Menthol mit dem verwendeten Integrator getrennt integrieren zu können, wäre eine bessere Auflösung notwendig, d.h. die Änderung der Steigung zwischen Frontschulter und Hauptpeak ist zu gering, um vom Integrator erkannt zu werden. Eine andere Möglichkeit, die Menthol-Peakfläche getrennt zu erfassen wäre, die Neigungsempfindlichkeit des Integrators so hoch einzustellen, daß die Integration erst bei der, verglichen mit der Frontschulter, steileren Flanke des Menthol beginnt. Dadurch wird jedoch die richtige Integration der anderen Peaks des Chromatogramms beeinträchtigt. Auch ist eine schlechtere Wiederholbarkeit der Flächen zu erwarten, da kleine Verzögerungen des Integrationsbeginns zu relativ großen Fehlern führen. Menthol ohne die Frontschulter

durch manuelle Bedienung des Integrators zu erfassen, dürfte kaum besser reproduzierbare Flächen liefern und wäre bei den relativ langsamen Trennungen mit einem großen Zeitaufwand verbunden, so daß Handauswertung der Chromatogramme einfacher wäre.

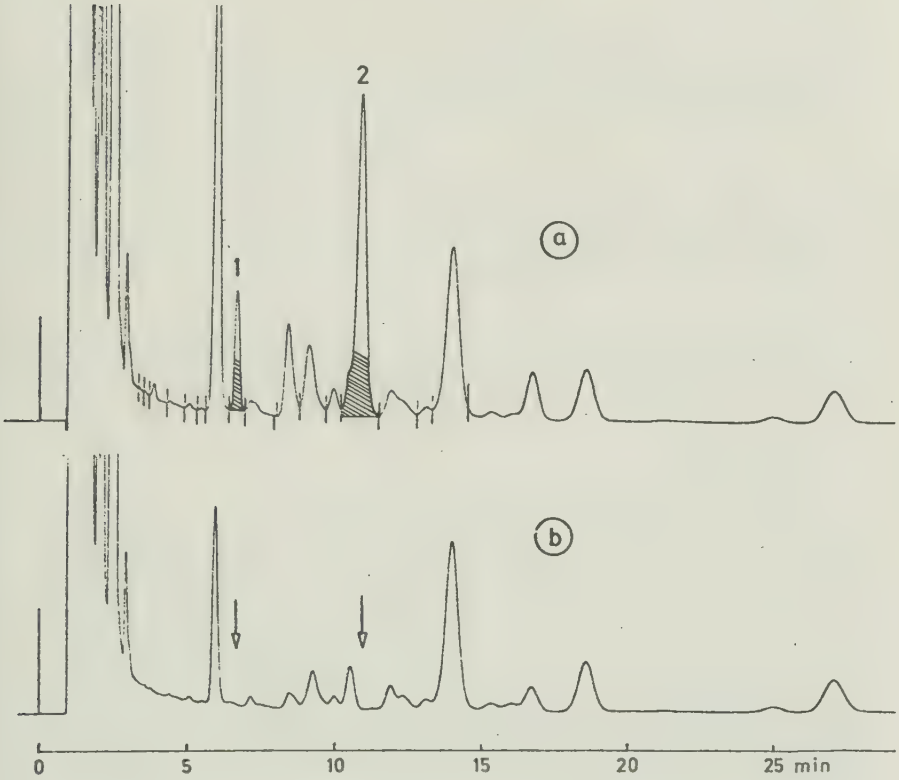


Abb. 3-11: Bestimmung von Menthaöl im Gemisch aller Öle,
a) 2 µl Eucalyptusöl, Pinusöl, Melissenöl und Menthaöl, zu je 0,4 % in Heptan,
b) 2 µl Eucalyptusöl, Pinusöl und Melissenöl, zu je 0,4 % in Heptan,
130°C Säulentemperatur, übrige Bedingungen wie in Abb. 3-10
1 = unbekannte Menthaöl-Komponente, 2 = Menthol

Um im Gemisch der Öle Menthol richtig bestimmen zu können, wären Säulen mit sehr viel größeren Trennstufenzahlen notwendig. Doch standen längere Säulen aus Glas nicht zur Verfügung, zum anderen wären für eine ausreichende Abtrennung der Frontschulter auf gepackten Säulen erheblich längere Analysenzeiten erforderlich.

Der folgende Versuch zeigt, in welchem Maße sich Peak 1 und 2 (= Menthol) (Abb. 3-11a) in einer Mischung aus gleichen Teilen aller vier Öle wiederfinden lassen. Hierbei wurde mit externem Standard (= Menthaöl) gearbeitet. Die Konzentrationen des Menthaöls in der Standardlösung und im Gemisch der Öle waren identisch. Die Lösungen wurden so bereitet, daß Fehler bei der Herstellung ausgeschlossen sind.

Der Mittelwert der Flächen des Peak 1 lag im Gemisch der 4 Öle um 1,7 % tiefer als im reinen Menthaöl, während die Peakfläche des Peak 2 (Menthol + Frontschulter) 12,6 % größer war als im externen Standard.

Die relative Standardabweichung der Peakflächen beider Peaks betrug für das Gemisch aller Öle $\pm$ 0,8 % (n = 8) und für das als externer Standard verwendete Menthaöl $\pm$ 0,3 % (n = 6). Eine Bestimmung des Menthaöls anhand der Hauptkomponente Menthol ist also bereits in einem Gemisch aus gleichen Teilen aller Öle bei den gewählten chromatographischen Bedingungen mit einem erheblichen systematischen Fehler behaftet. Dieser wird noch größer, wenn relativ kleinere Mengen Menthaöl in Gemischen bestimmt werden sollen.

Die von 100 % abweichende Wiederfindungsrate für Peak 1 dürfte auf unvollständige Integration zurückzuführen sein, z.B. durch eine höher angelegte Grundlinie, hervorgerufen durch mehrere nicht getrennte Spurenkomponenten.

3.4.5 Bestimmung des Cineols in Eucalyptusöl

Die Bestimmung von Eucalyptusöl in Ölgemischen schien anhand des Cineols am geeignetsten. Es kommt in Eucalyptus globulus-Ölen als Haptkomponente vor - DAB 7 und Ph.Eur. III fordern einen Gehalt von mind. 70 %. Es kann als stabiles Terpen betrachtet werden. Als cyclischer Äther ist es jedoch leicht flüchtig (Sdp_{760} 174° C) und daher gaschromatographisch schwierig von den ähnlich siedenden Monoterpen-Kohlenwasserstoffen abzutrennen, besonders vom schwerer flüchtigen Limonen des Melissenöls (Sdp_{760} 176° C).

In der Literatur[13] wird als stationäre Phase für derartige Trennungen PEG 400 empfohlen. Es ist polarer als das bisher verwendete PEG 20000 und kann somit besser zwischen den Kohlenwasserstoffen und dem wenig polaren Äther unterscheiden. Mit den benutzten Säulen wurde für das Substanzpaar Cineol/Limonen auf PEG 400 (10 proz. G/G, auf Kieselgur Merck, silanisert) eine relative Retention ($= k'_2/k'_1$) von 1,34 gefunden, auf PEG 20000 (5 proz. G/G, auf Chromosorb W, silanisiert) dagegen nur 1,11; d.h.: für Grundlinientrennung der beiden Stoffe ($R_s = 1,5$) wäre bei Vorliegen von gaußförmigen Peaks eine PEG 400-Säule mit 700 theoretischen Böden aber eine PEG 20000-Säule mit 6500 theoretischen Böden zu fordern.

Ein Nachteil des polareren PEG 400 ist der höhere Dampfdruck dieser stationären Phase, der eine geringere Lebensdauer der Säulen erwarten läßt. Auch lassen sich bei so niederen Temperaturen (max. Arbeitstemperatur 100° C) die in den anderen Ölen in größeren Mengen vorkommenden sauerstoffhaltigen Terpene nur sehr langsam oder gar nicht eluieren.

Nachdem auf dem thermisch stabileren PEG 20000 (2 % auf Chromosorb G, silanisiert, N = ca. 3500) bei programmierter Temperatur mit der 100-%-Methode ein Cineol-Gehalt des Eucalyptusöls von 78,7 % (Meßwert-%) gefunden worden war, wurden die weiteren Untersuchungen auf dem polareren PEG 400 durchgeführt.

Zum Auswerten der Peakflächen schien die Zumisch-Methode wenig geeignet, weil im Eucalyptusöl-Chromatogramm neben Cineol nur relativ kleine Peaks vorliegen, die bei Verwendung als Bezugspeakfläche keine große Genauigkeit erwarten lassen. Für die interne Standardisierung wäre Cyclohexylacetat (s. Tab. 3-3) als Standardsubstanz geeignet[13]. Das vorhandene Cyclohexylacetat hatte jedoch keine ausreichende Reinheit, so daß im folgenden nur mit externem Standard gearbeitet wird.

Abb. 3-12 zeigt ein Chromatogramm (a) des als Standard verwendeten Cineols und (b) des Eucalyptusöls. Die im Eucalyptusöl nach dem Cineol eluierte, unvollständig abgetrennte Spurenkomponente stört die Bestimmung des Cineols praktisch nicht. Eine bessere Auflösung dieser beiden Stoffe wäre durch geringere Säulentemperatur erreichbar, doch wurde darauf verzichtet mit Rücksicht auf die Analysenzeit und wegen der Eigenschaft des GC, derartig niedrige Temperaturen nicht konstant zu halten.

Die Elution der später eluierten sauerstoffhaltigen Monoterpene wurde nicht abgewartet. Diese können die Auswertung der nachfolgenden Analysen stören, so daß jene teilweise wiederholt werden mußten; in der Regel lagen aber die störenden Stoffe der vorhergehenden Analyse in der Nähe des Lösungsmittelpeaks der nachfolgenden Analyse oder ergaben so flache Peaks, daß für die Integration der Cineol-Flächen kaum Fehler entstanden.

Der Gehalt des Cineols im Eucalyptusöl errechnet sich wie bei der Geraniol-Bestimmung angegeben (Gleichung 4):

$$\% \text{ Cineol} = \frac{1976 \text{ mVs} \cdot 0{,}400 \text{ g} \cdot 99{,}6 \%}{2039 \text{ mVs} \cdot 0{,}496 \text{ g}} = 77{,}8 \%$$

Die relative Standardabweichung betrug sowohl für den Cineol-Peak in der Standardlösung (n = 5) als auch in der Eucalyptusöl-Lösung (n = 3) $\pm$ 0,7 %.

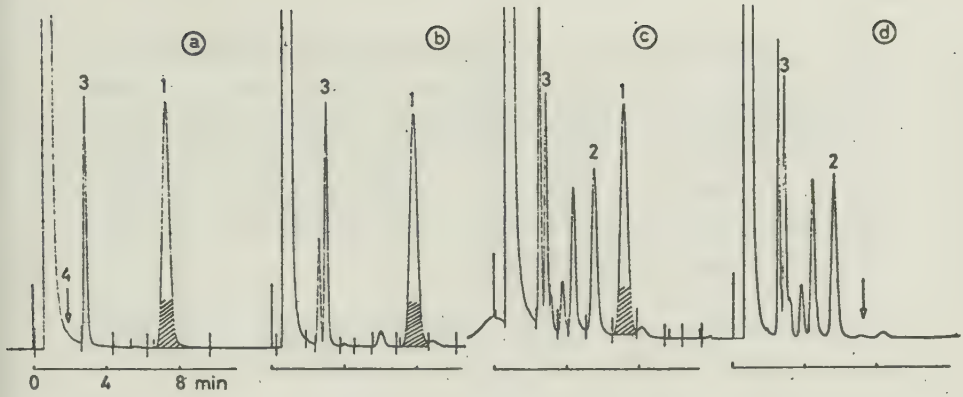


Abb. 3-12: Bestimmung des Cineols im Eucalyptusöl und im Gemisch der Öle,
a) 2 µl Cineol, zu 0,4 % in Heptan,
b) 2 µl Eucalyptusöl zu 0,5 % in Heptan,
c) 2 µl Eucalyptusöl, Melissenöl, Menthaöl und Pinusöl, zu je 0,5 % in Heptan,
d) 2 µl Melissenöl, Menthaöl und Pinusöl, zu je 0,5 % in Heptan;
Stahlsäule, 2 m, 3,2 mm ä.D., gefüllt mit 10 % PEG 400 auf Kieselgur Merck silanisiert, 0,2-0,3 mm; Ofentemperatur 90°C (bis 100°C, da nicht ganz konstant); Inj.- und Det.-Temp.: 150°; 20 ml N_2/min.
1 = Cineol, 2 = Limonen, 3 und 4 = Verunreinigungen des Probenlösemittels (3 = Toluol).

3.4.6 Bestimmung des Eucalyptusöls im Gemisch der Öle anhand des Cineols

Abb. 3-12 zeigt ein Chromatogramm aller 4 Öle (c) und der übrigen drei Öle ohne Eucalyptusöl (d) in etwa gleicher Konzentration. Im Gemisch der drei Öle, Melissen-, Mentha- und Pinusöl, wird ein kleinerer Peak mit der Retentionszeit des Cineols eluiert, d.h., dieser wird bei der Bestimmung des Eucalyptusöls im Gemisch zum Cineol-Peak addiert, so daß zu hohe Cineol-Gehalte zu erwarten sind. - Es wurde nicht versucht, diese Komponente durch Änderung der Säulentemperatur oder Säulenlänge vom Cineol abzutrennen.

Die Trennung Limonen/Cineol bereitete keine Schwierigkeiten. Fehler bei der Bereitung der Lösungen im Vergleich zu obiger Bestimmung des Cineols im Eucalyptusöl können ausgeschlossen werden: Von einer Eucalyptusöl-Stammlösung wurde dasselbe Volumen, das für die Bestimmung des Cineols im Eucalyptuslöl verwendet worden war, nach Zusatz der übrigen drei Öle in der gleichen Weise auf 100,00 ml aufgefüllt.

Als Auswertemethode wurde wie oben die externe Standardisierung verwendet. Der Gehalt errechnet sich wie folgt:

$$\% \text{ Cineol} = \frac{2001 \text{ mVs} \cdot 0{,}400 \text{ g} \cdot 99{,}6}{2069 \text{ mVs} \cdot 0{,}469 \text{ g}} = 82{,}2 \%$$

Der Cineol-Gehalt im Gemisch liegt also um 4,4 % höher als aufgrund der Einwaage des Eucalyptusöls zu erwarten wäre. Die relative Standardabweichung der Cineol-Flächen betrug sowohl für die Standardlösung (n = 4) als auch für die Analysenlösung (n = 5) $\pm$ 1,2 %.

Zu den aus der Literatur[13)] für die Cineol-Bestimmung übernommenen GC-Bedingungen sei erwähnt: Bei den untersuchten Ölgemischen können die spät eluierten sauerstoffhaltigen Monoterpene stärker stören als bei der Analyse von reinen Ölen, die - wie in der Veröffentlichung - Cineol zu mehr als 40 % enthalten. Es mag daher ratsam sein, eine höher erhitzbare stationäre Phase zu verwenden (z.B. PEG 1500, max. Arbeitstemperatur 150° C, die eine längere Lebensdauer der Säule erwarten läßt und ein schnelleres Austreiben der schwerer flüchtigen Komponenten ermöglicht. Die damit erhaltene geringere Selektivität für die Trennung der MT-Kohlenwasserstoffe von Cineol könnte ohne große Anstrengungen durch Säulen mit höheren Trennstufenzahlen ausgeglichen werden.

Bei der Bestimmung von Eucalyptusöl neben Mentha-Ölen anhand des Cineols ist zu beachten, daß besonders Mentha-piperita-Öle 4 - 7 % Cineol enthalten können[7)].

3.4.7 Gleichzeitige Bestimmung aller 4 Öle im Gemisch

Bei den Bestimmungen der Einzelöle im Gemisch war bisher mit konstanter Säulentemperatur gearbeitet worden. Isothermes Arbeiten hat folgende Vorteile:

- besser reproduzierbare Retentionszeiten und eventuell auch Peakflächen,
- sicherere Integration der Peakflächen, da die Grundlinie während der Trennung konstant bleibt,
- einfacher ausgerüstete und damit billigere GC-Geräte.

Es hat den Nachteil, daß auf schwerer flüchtige Verbindungen teilweise sehr lange gewartet werden muß, wenn die Integration der nachfolgenden Analyse nicht gestört sein soll.

Um a l l e Öle nebeneinander anhand der unterschiedlich flüchtigen Inhaltsstoffe bestimmen zu können ist temperaturprogrammiertes Arbeiten unumgänglich.

Abb. 3-13 zeigt eine Trennung des Gemisches aller Öle mit ansteigender Säulentemperatur, wie sie bei der gleichzeitigen Bestimmung der 4 Öle erhalten wurde.

In Tab. 3-6 sind in Spalte 3 für die bisher bestimmten Komponenten die gefundenen %-Gehalte zusammengestellt. Sie können - besonders bei unvollständiger Auflösung - Anhaltspunkte über den zu erwartenden Fehler einer Bestimmung geben. In Spalte 4 sind die Wiederfindungsraten der in Abb. 3-13 bezeichneten Peaks im Gemisch der Öle bei programmierter Temperatur wiedergegeben. Die Wiederfindungsraten wurden bestimmt durch Vergleich der Peakflächen des betreffenden Peaks im Einzelöl (= 100 %) und im Gemisch der Öle (externe Standardisierung). Die Lösungen wurden so bereitet, daß die Konzentrationen der Öle im Vergleich und im Gemisch identisch waren, und daß die vier Öle im Gemisch in etwa gleichen Mengen vorlagen.

Den Berechnungen wurde nur je ein Wert zugrunde gelegt,

a) da es nicht möglich war, mit e i n e m Integratorprogramm alle Peaks richtig zu erfassen, d.h. die Integratoreinstellung mußte zu Beginn und während jeder Trennung manuell verändert werden;

b) da Fehler erwartet wurden, die größer sind als die Dosierungsungenauigkeit, z.B. durch Peaküberlagerungen oder durch fehlerhafte Integration von Peaks, die auf der mit steigender Temperatur driftenden Grundlinie sitzen. Die relative Standardabweichung einer gut zu integrierenden Peakfläche lag in dem bisher gefundenen Bereich: $\pm$ 0,9 % (n = 3).

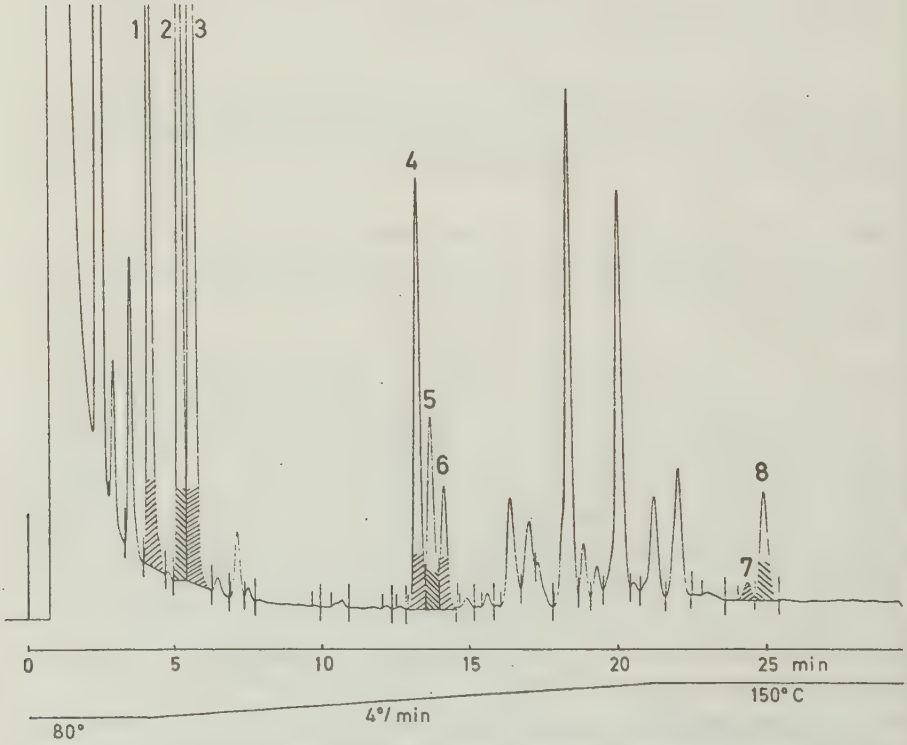


Abb.3-13: Bestimmung aller vier Öle nebeneinander mit Temperaturprogramm; 2 µl einer Lösung von Melissenöl, Menthaöl, Pinusöl und Eucalyptusöl, zu je 0,4 % in Heptan; Säule D in Tab. 3-5; Säulentemperatur: 4 min bei 80°, mit 4°/min nach 150° und 8 min bei 150°C; Inj.- und Det.- Temp.: 250°C; 20 ml N_2/min. Zur Nummerierung der Peaks siehe Tab. 3-6.

Tabelle 3-6: Wiederfindungsraten der einzelnen Öle im Gemisch der vier Öle bei isothermer und temperaturprogrammierter Arbeitsweise (s. Abb. 3-13) anhand der bezeichneten Peaks

Peak	Inhaltsstoff	%-Gehalt im Einzelöl	Wiederfindungsrate in Abb.3-13	Wiederfindungsrate bei den isothermen Bestimmungen und rel. Standardabweichungen	
1	MT-KW des Pinusöls		105,6 %		
2	Limonen des Melissenöls		136,4 %		
3	Cineol des Eucalyptusöls	77,8	100,4 %	104,4 %	± 1,2 %
4	Menthon des Menthaöls	26	98,9 %		
5	Citronellal des Melissenöls		100,4 %		
6	Menthaöl-Inhaltsstoff	7	107,8 %	98,3 %	± 0,8 %
7	ST-KW des Pinusöls	2	113,3 %		
8	Geraniol des Melissenöls	7,4	98,7 %	94,5 % [a)]	± 0,8 %

a) Bei dieser Bestimmung des Melissenöls anhand des Geraniols war es die Absicht gewesen zu zeigen, wie schlechte Werte bei unvollständiger Auflösung erhalten werden. Bei Ausführung der Bestimmung auf einer doppelt so langen Säule, bei sonst gleichen Bedingungen, wären Wiederfindungsraten für Melissenöl von besser 98 % zu erwarten.

Die Wiederfindungsraten in Tab. 3-6 zeigen, daß sich auch mit Temperaturprogramm brauchbare Bestimmungen durchführen lassen - wenn auch nur bei relativ langen Analysenzeiten (35 min) und bei dem verwendeten Integrator nicht mit völlig automatischem Betrieb.

Gute Ergebnisse sind für die bereits bei der Bestimmung des Eucalyptusöls und des Melissenöls verwendeten Peaks des Cineols (Peak 3) und des Geraniols (Peak 8) zu erwarten.

Weniger gut ist die Wiederfindungsrate bei Peak 6, der bei isothermen Bedingungen für die Bestimmung des Menthaöls im Gemisch verwendet worden war. Dies erklärt sich damit, daß bei den gewählten Bedingungen Menthon (Peak 4) und Citronellal (Peak 5) besser getrennt werden als in Abb. 3-2 oder 3-11. Die relative Retention Menthon/Citronellal ist abhängig von der Säulentemperatur,

dagegen wird die Retention von Menthon im Vergleich zu dem nachfolgenden Menthaöl-Peak (Peak 6) kaum beeinflußt, so daß mit besserer Trennung Menthon/Citronellal die Auflösung Citronellal/Peak 6 abnimmt.

Keine genauen Ergebnisse liefern die bisher von den Bestimmungen ausgeschlossenen Monoterpen-Kohlenwasserstoffe. Limonen (Peak 2) fällt mit einigen größeren Peaks der anderen Öle zusammen. Unter dem Monoterpen-Kohlenwasserstoff-Peak des Pinusöls (Peak 1) liegen ebenfalls einige kleinere Peaks der anderen Öle. Dennoch erscheint die Bestimmung des Pinusöls neben den drei anderen Ölen anhand dieses Peaks sinnvoller als anhand des Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffs (Peak 7), der nur zu etwa 2 % im Pinusöl vorkommt. Peaks, die in Abb. 3-13 nicht gekennzeichnet sind, zeigten schon beim visuellen Vergleich der Chromatogramme der Einzelöle Überlappungen mit ähnlich großen Peaks der anderen Öle, so daß auf eine Bestimmung der Wiederfindungsraten verzichtet wurde.

3.5 Diskussion der GC-Untersuchungen

Es zeigte sich bei den GC-Bestimmungen der ätherischen Öle im Gemisch, daß Fehler weniger durch Ungenauigkeiten der chromatographischen Methode oder durch Zersetzungen der Terpene verursacht werden, als vielmehr durch fehlerhafte Integration oder durch Überlagerungen des zu bestimmenden Peaks mit Peaks der anderen im Gemisch vorliegenden Öle.

Auf gepackten Säulen mittlerer Länge mit PEG 20000 als stationärer Phase ließen sich weder im Einzelöl noch im Gemisch der Öle alle Inhaltsstoffe getrennt eluieren. Es konnten jedoch für jedes der Öle Peaks gefunden werden, die für eine Produktkontrolle einigermaßen richtige und genaue Bestimmungen der Öle im Gemisch zuließen.

Die gefundenen Wiederfindungsraten bei isothermem oder temperaturprogrammiertem Arbeiten und die Genauigkeiten der Bestimmungen der einzelnen Öle neben etwa gleichen Mengen der anderen drei Öle sind in Tab. 3-6 zusammengefaßt. Die Fehlerursachen sind bei den Einzelbestimmungen diskutiert.

Die Wiederfindungsrate, d.h. die Richtigkeit einer Bestimmung ist abhängig von der Auflösung und der Peakflächenerkennung durch den elektronischen Integrator. Im ungünstigsten Fall wurden systematische Fehler von 5 % durch Peaküberlagerungen gefunden.

Fehler durch Zersetzungen konnten bei den Trennungen der Öle nicht beobachtet werden; diese waren nur mit Testgemischen empfindlicherer Reinsubstanzen nachzuweisen und zeigten nicht das aufgrund der Literatur erwartete Ausmaß.

Die mit den verwendeten Geräten erreichbare Genauigkeit lag bei der meistens angewandten e x t e r n e n S t a n d a r d i s i e r u n g für 2 µl Probevolumen und für ausreichend getrennte und gut zu integrierende Peaks um ± 1 %.

Größere Genauigkeiten sind bei Verwendung der i n t e r n e n S t a n d a r d i s i e r u n g zu erreichen. Die Standardabweichungen der Flächenverhältnisse von Peaks desselben Chromatogramms waren kleiner 0,25 % (relativ). Als interne Standards konnten jedoch nur Cyclohexylacetat und Dodecanol gefunden werden, wobei der Fehler der Dodecanolwerte infolge erschwerter Integration und Überlappung mit anderen Peaks größer war als der Streuungsfehler der zu bestimmenden Geraniolfläche (s. 3.4.1).

Die Zumisch-Methode läßt sich für die Bestimmung eines Öls im Ölgemisch nur anwenden, wenn die entsprechende Reinsubstanz zugewogen wird; das entsprechende Öl zuzuwiegen dürfte in den meisten Fällen auch die Fläche des ausgewählten Bezugspeaks verändern.

Die 100-%-Methode kann nur Näherungswerte liefern, da einmal die Response-Faktoren besonders für die Kohlenwasserstoffe und die sauerstoffhaltigen Terpene unterschiedlich sind und zum anderen eine richtige Integration aller Peaks im Gemisch kaum möglich ist.

Bei unvollständig aufgelösten Peaks kann Handauswertung der Chromatogramme zu richtigeren, wenn auch stärker streuenden Ergebnissen führen als die elektronische Integration. Bei der Auswertung über die Peakhöhen ist zu beachten, daß einige Inhaltsstoffe unsymmetrisch eluiert werden (fronting auf PEG 20000 z.B. bei Menthol, Geraniol, Dodecanol und Cineol) und Peakhöhen liefern, die nicht linear mit der Probemenge zunehmen. Die über die elektronische Integration gemachten Aussagen gelten natürlich nur für Integratoren, die ähnlich arbeiten wie das verwendete Gerät (hp 3370 B).

Zu den chromatographischen Bedingungen sei erwähnt:
Sicherlich ließen sich durch Einsatz verschiedener stationärer Phasen, durch Vortrennung des Analysengemisches mit anderen Methoden, durch Kapillarchromatographie oder durch Säulenschalten einige Komponenten besser abtrennen (s.a. 3.1.4), so daß für alle Öle des Gemisches optimale Bestimmungen möglich sind, doch dürften die gewählten Bedingungen bei kleinen Probenzahlen einen brauchbaren Kompromiß darstellen.

PEG 20000 erwies sich als ausreichend temperaturstabil. Sofern nicht unnötig hohe Temperaturen zum Ausheizen der Säule verwendet werden - 170° bis 180° C waren in der Regel ausreichend -, dürfte die Lebensdauer der Säulen 3 Monate bei Dauerbetrieb übersteigen. An anderer Stelle ist eine Lebensdauer von über einem Jahr angegeben[73].

Als Trägermaterial erwies sich zu Beginn der Arbeiten Chromosorb W AW DMCS, 0,18 - 0,25 mm, als geeignet. Günstig wäre, für die schwierigeren Trennungen eine kleinere Korngröße (0,15 - 0,18 mm) zur Erreichung größerer Trennstufenzahlen zu

verwenden. Die Säulenlänge kann nur für einfache Trennungen kleiner 4 m gewählt werden.

Der Belegungsgrad von 5 % war in der Absicht gewählt worden, mit möglichst niedrigeren Säulentemperaturen auszukommen, um Zersetzungen zu vermeiden. Da diese nicht in dem erwarteten Maße auftraten, dürfte auch die in der Literatur häufiger verwendete 10 proz. Imprägnierung (auf Chromosorb W) gute Ergebnisse bringen (und eventuell zu höherer Lebensdauer der Säulen führen).

Als Säulenwandmaterial war überwiegend Glas verwendet worden, aber auch Stahlsäulen können eingesetzt werden, solange die Säulentemperatur 170° C nicht überschreitet, wie es z.B. für die Elution der sauerstoffhaltigen Sesquiterpene notwendig wäre[82)]. Auf Glaseinsatz im Injektor sollte bei quantitativen Bestimmungen nicht verzichtet werden.

Die ausgeführten Bestimmungen können allerdings nur beispielhaft sein und sind nur in beschränktem Maße übertragbar: In Abhängigkeit u.a. vom Trägermaterial, vom Imprägnierungsgrad und von der Art der Konditionierung - Faktoren, die nicht gut reproduzierbar sind - kann die Selektivität der Säule unterschiedlich sein. Zum anderen kann sich das Analysenproblem ändern mit jedem weiteren dem Gemisch zugesetzten Öl oder mit jeder neuen Lieferung eines der bereits verwendeten Öle: Es kann der bisher bestimmte Peak fehlen oder durch größere Überlappung mit neu hinzu gekommenen Peaks unbrauchbare Werte liefern, so daß die chromatographischen Bedingungen zu ändern sind oder ein anderer gut zu bestimmender Peak gesucht werden muß.

4. FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE[16,28-44,85)]

4.1 Vergleich zwischen GC und LC

Während GC-Trennungen der ätherischen Öle praktisch nur auf flüssigen stationären Phasen (GLC) ausgeführt werden, bestehen keine derartigen Beschränkungen in der LC. Sowohl Sorbenzien mit entsprechend großer Oberfläche als auch flüssige stationäre Phasen (LLC) bieten sich für die Chromatographie der Terpene an. Die LSC dürfte im allgemeinen bei Trennungen nach der Anzahl und Stellung von Doppelbindungen oder funktionellen Gruppen bessere Ergebnisse bringen, während die LLC vorteilhafter bei Trennungen von Gliedern einer homologen Reihe oder bei Trennungen nach der Molekülgröße einzusetzen ist. Die anderen LC-Methoden, IEC und GPC, dürften in der Terpenanalytik nur für spezielle Probleme Anwendung finden.

In der GLC erfolgt die Trennung der Stoffe überwiegend nach Dampfdruck und Löslichkeit in der stationären Phase. Stärkere Bindungen an aktive Stellen des Trägers oder an polare Gruppen der flüssigen stationären Phase sind unerwünscht: Sie führen zu Tailing, irreversibler Adsorption oder Zersetzungen. In der LC werden Retention und Selektivität durch Wechselwirkungen mit der stationären u n d der mobilen Phase beeinflußt. Es ist mit dieser Methode möglich, nicht nur höhersiedende, sondern auch polarere oder dissoziierte Verbindungen zu chromatographieren. Die Selektivität des Systems läßt sich in der LC - auch ohne Austausch des Säulenfüllmaterials - durch unterschiedlich zusammengesetzte Fm-Gemische über einen größeren Bereich variieren als in der GC. Daher ist es auch möglich, daß sich Stoffe, die sich aufgrund ihrer Flüchtigkeit und Stabilität für die GC anbieten, wegen der besseren Selektivität bequemer durch LC bestimmen lassen.

Während in der GC die Säulentemperatur die eluierende Kraft ist, kommt in der LC der Fließmittel(Fm)-Stärke diese Rolle zu. Temperaturerhöhung führt zwar auch in der LC zu kürzeren

Retentionszeiten, verringert jedoch meist auch die Unterschiede in den Wechselwirkungen zur mobilen oder stationären Phase, und sie wird in der Regel nur zur Erniedrigung der Fm-Viskosität, zur Erreichung geringerer Trennstufenhöhen oder zur Erhöhung der Löslichkeit der Probe (z.B. bei Polymeren) eingesetzt.

Weitere Unterschiede zwischen GC und Flüssigkeits-Säulenchromatographie, die sich vor allem auf die Konstruktion der Säulen und Apparate auswirken, sind:

- Die Diffusionskoeffizienten von Gasen sind etwa 10000 mal kleiner als die von Flüssigkeiten. Dies ist die Hauptursache für die kleineren Korngrößen der LC.
- Die Viskositäten von Gasen sind etwa 100 mal kleiner als die der Flüssigkeiten. Entsprechend unterscheiden sich die Säuleneingangsdrucke der beiden Methoden.
- Die Detektion einer Substanz ist in einem Gas im allgemeinen weniger gestört als in einer flüssigen mobilen Phase, die ähnliche Stoffeigenschaften wie die gelöste Probensubstanz besitzt und die sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein kann. Dies erklärt das Fehlen empfindlicher und unspezifischer Detektoren in der LC.
- Das Sammeln von Fraktionen ist in der LC auch bei sehr kleinen Substanzmengen problemloser. Für präparative Zwecke ist die LC u.a. auch wegen der größeren Belastbarkeit der mobilen und der stationären Phase besser geeignet.
- Schließlich bietet sich in der LC die Möglichkeit, die mobile Phase durch Kapillarwirkung in den Zwischenräumen des Trägers vorwärts zu bewegen. Dies ist die Voraussetzung für das gleichmäßige Fließen in offenen Systemen (PC, DC), deren Vorzüge im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.2. Dünnschichtchromatographie

4.2.1 Vergleich DC - HPLC[33,86-88]

Die moderne Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)[18-44] zeigt sich den älteren flüssigchromatographischen Methoden, wie PC, DC oder konventionelle Säulenchromatographie, zwar bezüglich Trennstufenzahlen und Analysengeschwindigkeiten überlegen, doch besitzen jene - vor allem die DC - Vorzüge, die es nützlich erscheinen lassen, erst nach Vorversuchen mit der Flachbett-Chromatographie eine Trennung auf der Säule zu versuchen. Voraussetzung dafür ist, daß in der DC die gleiche stationäre Phase zur Verfügung steht, mit der man in der HPLC zu arbeiten wünscht. Dies ist bei der eigene Wege gehenden Entwicklung der HPLC-Trägermaterialien nicht immer gegeben.

Einige Vorzüge der DC gegenüber der HPLC sind in Tab. 4-1 zusammengefaßt. Die angeführten Argumente sprechen nicht gegen die HPLC; sie sollen nur verdeutlichen, daß der schnellere Weg zu einer HPLC-Trennung über DC-Vorversuche führt, besonders wenn ein Optimum an Selektivität des chromatographischen Systems angestrebt wird.

Tabelle 4-1: Vorzüge der DC gegenüber der HPLC

DC	HPLC
Fließmittelwechsel ist einfach und schnell	Um konstante Bedingungen zu erhalten, ist gründliches Durchspülen der Leitungen mit dem neuen Fm erforderlich. Dies ist je nach Art der Pumpe und Dämpfung unterschiedlich zeitraubend und kann länger dauern als das Konditionieren der Säule. Hinzu kommt, daß die verwendeten Lösemittel eine größere Reinheit aufweisen als in der DC, z.B. rückstandsfrei, UV-rein, frei von polareren Verunreinigungen.

Fortsetzung Tab. 4-1:

DC	HPLC
Die Aktivität der stationären Phase oder auch das Belegen des Trägers mit anderen Flüssigkeiten (Dämpfen) läßt sich relativ schnell und einfach einstellen, z.B. mit der Vario-KS-Kammer[89]	Um den Wassergehalt des Sorbens in der Säule zu verändern, ist es erforderlich, mit dem neuen, auf einen definierten Wassergehalt eingestellten Fm längere Zeit durchzuspülen. Je nach Polarität und Wassergehalt des Fm können hierzu mehrere 100 Säulentotvolumina[90] notwendig sein.
Mehr Detektionsmöglichkeiten: Neben der Auswertung im Sichtbaren, im UV oder durch Fluoreszenz können chemische Reaktionen im Anschluß an die Chromatographie einfach und schnell und teilweise nacheinander durchgeführt werden.	Um eine Substanz detektieren zu können, muß sie sich in ihren Eigenschaften deutlich vom Fm unterscheiden. Chemische Reaktionen nach der Säule führen meist zu Verlust an Trennschärfe und erfordern einen größeren apparativen Aufwand.
Mehrere Analysen oder Vergleichsstoffe können n e b e n einander chromatographiert werden.	Die Proben müssen n a c h einander chromatographiert werden, was - auch bei sehr schnellen Analysen - im Schnitt mehr Zeit erfordert.
Am Start zurückgebliebene Komponenten stören nicht, da die stationäre Phase nur einmal verwendet wird und die ursprünglich vorhandenen Bedingungen mit jeder neuen Platte wiederhergestellt sind.	Am Start zurückgebliebene Komponenten beeinflussen früher oder später die Trennung der nachfolgenden Analysen. Herunterspülen dieser Stoffe mit Fm größerer Elutionskraft erfordert meist längeres Rekonditionieren der Säule.
Fm-Gradienten oder andere Gradienten sind einfach zu verwirklichen und gut wiederholbar. Allerdings ist weniger genau bekannt, wie die Fm-Stärke mit der Wegstrecke zunimmt.	Fm-Gradienten erfordern einen großen apparativen Aufwand und lange Analysenzeiten. Für gute Wiederholbarkeit müssen u.U. die Rekonditionierungszeiten genau eingehalten werden.

4.2.2 Ziel der DC-Untersuchungen

Es war die Absicht,

- anhand von Vergleichsstoffen Einblick zu gewinnen in das chromatographische Verhalten der zu untersuchenden Stoffgemische, und die Abhängigkeit der Selektivität der Trennungen vom Fm und vom Wassergehalt des Sorbens kennenzulernen,
- durch Mitchromatographieren von Vergleichsstoffen und durch Vergleich mit Literaturdaten einen Teil der Inhaltsstoffe zu identifizieren,
- geeignete Komponenten auszuwählen, die für die Bestimmung mit selektiven HPLC-Detektoren (UV, evtl. auch Fluoreszenz) geeignet sind,
- mit Hilfe der DC halbquantitative Aussagen über das Vorkommen einiger Inhaltsstoffe zu machen.

4.2.3 Wahl der chromatographischen Bedingungen

4.2.3.1 Sorbenzien und Fm der Literatur

Aus der sehr umfangreichen DC-Literatur der ätherischen Öle[70,91,92] kann entnommen werden:

Als Trägermaterial wurde schon in der ersten Veröffentlichung (1951)[10] Kieselgel als bestens geeignet für die Chromatographie der Terpene gefunden. Dieses wurde auch in den späteren Arbeiten überwiegend verwendet. Andere Trägermaterialien besitzen nur geringfügig andere Trenneigenschaften oder zeigen weniger starke Wechselwirkungen mit den lipophilen Öl-Inhaltsstoffen, so daß Fm mit geringerer Fm-Stärke verwendet werden müssen, wodurch nicht zuletzt die Auswahl an Fm eingeschränkt wird. Kieselgel hat darüber hinaus den Vorteil, daß es sich mit guter Reinheit und Reproduzierbarkeit der Porengröße darstellen läßt. (Verunreinigungen, z.B. Eisenoxide, erwiesen sich häufig als Ursache für Stoffveränderungen. Mit der Poren-

größe ändert sich die spezifische Oberfläche und u.U. auch die Selektivität des Sorbens.)

An Fließmitteln wird in der Literatur verwendet:

a) Für die Trennung der Terpen-Kohlenwasserstoffe: Niedere Kohlenwasserstoffe oder -Gemische (Pentane, Hexane), doch wird damit keine befriedigende Trennung erhalten. Die Rf-Werte liegen zwischen 0,7 und 1,0. Durch Erhöhung der Aktivität des Kieselgels werden zwar die R_f-Werte kleiner, doch nehmen auch Stoffumlagerungen und das Tailing der Substanzflecke zu. Teilweise bessere Trennungen geben Fm mit noch geringerer Fm-Stärke (z.B. Fluorkohlenwasserstoffe[93]) oder Änderungen der stationären Phase, wie z.B. die Imprägnierung mit Silbernitrat[94] (Trennung nach der Zahl der ungesättigten Bindungen) oder mit Undecan oder anderen lipophilen Stoffen ("Reversed-Phase").

b) Für die Trennung der sauerstoffhaltigen Terpene:
Einkomponenten-Fm: Aromaten (Benzol, Toluol), halogenierte Kohlenwasserstoffe (Dichlormethan, Dichloräthan, Isopropylchlorid), Äther (Diäthyläther, Diisopropyläther),
Mehrkomponenten-Fm: Mischungen aus Alkanen oder Aromaten mit Chlorkohlenwasserstoffen, Äthern, Estern oder Alkoholen; auch Chloroform gehört hierher, das als zweite Komponente stets Alkohol (1 - 3 %) enthält. Am häufigsten findet man in der Literatur das Fm Benzol + Äthylacetat, 95 + 5 oder 90 + 10.

Mehrkomponenten-Fm sind in der Lage, je nach Fm-Zusammensetzung und Kammerform, einen mehr oder weniger steilen Fm-Gradienten auf der Platte auszubilden. Dies kann bei der unterschiedlichen Polarität der ätherischen Öl-Inhaltsstoffe (KW, Ester, Äther, Aldehyde, Ketone, Alkohole, Phenole und evtl. auch Säuren) von Vorteil sein.

Bei den LC-Untersuchungen konzentrierte sich das Interesse, wie schon in der GC, auf die sauerstoffhaltigen Terpene. Bei den Kohlenwasserstoffen wären eventuell aromatische KW durch

UV zu detektieren, doch besitzen jene keine großen ε-Werte. Die α,β-ungesättigten Terpen-KW dürften - soweit sie genügend langwellige Maxima (> 215 nm) besitzen - schwer zu trennen sein. (Weitere Faktoren, die eine Bestimmung der Kohlenwasserstoffe unvorteilhaft erscheinen lassen, siehe 3.2.)

4.2.3.2 Für die DC-Arbeiten verwendete chromatographische Systeme - Kammerform und zu erwartende Eigenschaften der Fm

Für die Trennung der sauerstoffhaltigen Terpene wurde fast ausschließlich mit ungesättigten Sandwich-Kammern (S-Kammern) in Verbindung mit Einkomponenten-Fm gearbeitet. Dieses System hat folgende Vorteile:

- Die R_f-Werte lassen sich besser reproduzieren und eignen sich für die Berechnung von Säulenretentionsdaten
- Geringe Mengen polarer Verunreinigungen der Fm stören nicht.

Die Verwendung von Mehrkomponenten-Fm hätte den Vorzug, daß die Selektivität eines chromatographischen Systems sehr viel nachhaltiger beeinflußt werden kann, da durch die Fm-Komponente(n) mit der größeren Elutionskraft häufig auch die Eigenschaften der stationären Phase verändert werden. Für richtige und gut wiederholbare Ergebnisse ist jedoch eine gleichmäßige Konditionierung der Platte erforderlich, d.h., bei Verwendung von S-Kammern darf die Probe erst aufgegeben werden, wenn die letzte Fm-Front eine hinreichend große Wegstrecke zurückgelegt hat. Liegt die Komponente mit der größeren Elutionskraft nur in geringer Menge vor (kleiner 10 %), so werden die Konditionierungszeiten in S-Kammern sehr lang. Derartige Fm-Gemische werden allgemein nur in N-Kammern eingesetzt.

Mit der Verwendung von Einkomponenten-Fm wurde gleichzeitig auf für die Auflösung optimale R_f-Werte um 0,3 verzichtet. Allerdings sind größere R_f-Werte bei den ätherischen Ölen noch durchaus vorteilhaft, da sich Überladungen der Schicht mit

zunehmender Laufstrecke weniger bemerkbar machen. Überladungen sind bei den untersuchten Vielkomponenten-Gemischen, die überwiegend aus wenigen Hauptkomponenten zusammengesetzt sind, praktisch nicht zu vermeiden, wenn Nebenkomponenten nachgewiesen werden sollen.

Die im folgenden verwendeten Einkomponenten-Fm sollten sich, wie eingangs erwähnt, in ihren chromatographischen Eigenschaften möglichst unterscheiden, da vor allem interessierte, inwieweit sich die Selektivität des Systems durch Änderung des Fm beeinflussen läßt. Zu diesem Zweck wurden ein aromatischer KW (Toluol), ein Chlorkohlenwasserstoff (Dichloräthan) und ein Äther (Di-n-butyläther) ausgewählt, die in etwa die erforderliche Fm-Stärke haben. Um Abdampfungseffekte klein zu halten - die S-Kammern sind nicht vollkommen dicht -, wurden bewußt höhersiedende Lösemittel bevorzugt. Für die Wahl des Butyläthers war noch entscheidend, daß die niedersiedenden Homologen polarer sind und die Fm-Stärke des Butyläthers ohnehin schon zu groß ist (Dielektrizitätskonstanten: Diäthyläther 4,3; Diisopropyläther 3,9; Di-n-butyläther 3,1) Anhaltspunkte für die zu erwartende Selektivität eines Lösemittels lassen sich z.T. der Literatur entnehmen. In Tab. 4-2 sind die interessierenden Parameter der einzelnen Fm oder deren Homologen wiedergegeben.

Tabelle 4-2: Chromatographische Eigenschaften der drei Einkomponenten-Fm

Tabelle 4-2a: Mögliche Wechselwirkungen der mobilen Phase im chromatographischen System[96)]

Fließmittel	Benzol	Dichlormethan	Isopropyläther
Dispersionskräfte	+++	++	+++
Dipolkräfte	-	+++	++
H-Akzeptor	+	-	+++
H-Donator	-	+	-
Koordinationskräfte	+	+	++
Ionenbindung	-	-	-

Tabelle 4-2b: Löslichkeitsparameter δ nach Hildebrand[33)]

Lösemittel	Toluol[a)]	Dichloräthan[b)]	Isopropyläther
Löslichkeitsparameter, δ	8,9	9,7	7,0
Dispersions-Löslichkeitsparameter, δ_d	8,9	8,2	6,9
Dipol-Löslichkeitsparameter, δ_o	0	4	0,5
H-Akzeptor, δ_a	0,5	0	0,5
H-Donator, δ_h	0	0	0

Tabelle 4-2c: Fm-Stärken ε° nach Snyder[89)]

Lösemittel	Toluol[a)]	Dichloräthan[b)]	Isopropyläther
für Aluminiumoxid	0,29	0,49	0,28
für Kieselgel	0,25	< 0,39[c)]	0,28[c)]

a) dem Benzol vergleichbar,
b) dem Dichlormethan vergleichbar,
c) geschätzt.

Von sehr guter Übereinstimmung zwischen den aus zwei verschiedenen Tabellen zitierten Werten kann nicht gesprochen werden. Besonders verwirrend sind die sich aus Tab. 4-2 ergebenden eluotropen Reihen der Lösemittel. In der Hildebrand-Skala (Tab. 4-2b) die für die Verteilungschromatographie ausgearbeitet wurde, nimmt die Fm-Stärke von Isopropyläther über Toluol nach Dichloräthan zu; aufgrund der Snyderschen ε°-Werte (Tab. 4-2c), die durch LSC auf Aluminiumoxid ermittelt wurden und die für Kieselgel z.T. geschätzt werden mußten, ergibt sich eine Zunahme der Fm-Stärke von Toluol über Isopropyläther nach Dichloräthan; bei den eigenen Arbeiten schließlich zeigte sich eindeutig eine Zunahme der eluotropen Kraft von Toluol über Dichloräthan nach Dibutyläther (für Kieselgel).

Auf die Diskussion neuerer Arbeiten, um die Fm-Selektivität eines Systems vorherzusagen, wurde verzichtet. Diese wurden aus teilweise sehr viel mehr Daten ermittelt und sollten sicherere Voraussagen erwarten lassen. Praktisch kann aber keine der Methoden allgemeine Gültigkeit beanspruchen, da sich die Trennmechanismen mit der Art der Probe, der Fm-Stärke und/oder der Art des Sorbens ändern. Erwähnt seinen die Rohrschneider-Daten[97,98] und der Übersichtsartikel von Snyder[99].

4.2.4 Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe

Um die Selektivität der drei Einkomponenten-Fm beurteilen zu können, wurden die R_f-Werte der meisten der vorhandenen Vergleichssubstanzen ermittelt. Dabei wurden auch Substanzen verwendet, die aufgrund der Literatur kaum in den zu untersuchenden Ölen zu erwarten sind. Sie finden sich jedoch häufig in der DC-Literatur der ätherischen Öle, so daß sie beim Vergleich mit anderen chromatographischen Arbeiten von Nutzen sind.

4.2.4.1 R_f-Werte der Vergleichssubstanzen in den 3 Einkomponenten-Fm

In Tab. 4-3 sind die mit den drei Einkomponenten-Fm erhaltenen hR_f'- und R_m'-Werte aufgeführt. Die R_m'-Werte wurden angegeben, da sie in linearer Beziehung stehen zu den Einflußgrößen der DC und den Struktureinheiten der betreffenden Substanzen[100]. Sie sind ein besseres Maß für die Trennmöglichkeiten zweier Stoffe auf der Säule und leichter in k'-Werte umzurechnen, die in der Säulenchromatographie verwendet werden ($R_m' = \log k'$). Gleiche ΔR_m'-Werte zweier Stoffpaare bedeuten gleiche relative Retention.

In Abb. 4-1 sind die R_m'-Werte graphisch wiedergegeben, um Selektivitätsunterschiede der drei Fm besser abschätzen zu können. Als Maß für das Vertrauen, das in die erhaltenen R_f-Werte gesetzt werden kann, mögen die Streuungen der Werte einer auf jedem DC mitgeführten Standardsubstanz dienen. (Etwa die Hälfte der Werte wurde auf den äußersten Bahnen der DC-Platten gefunden.)

hR_f-Werte von Menthol in Toluol auf drei verschiedenen Platten an einem Tag: 7,0; 7,3; 7,3; 7,2; 7,7.
hR_f-Werte von Piperiton in Dichloräthan auf 7 Platten an drei Tagen: 25 25,5 25,5; 26 26; 24,5; 25,5 25; 24,5 25 25,5; 25; 23.
hR_f-Werte von Piperiton in Butyläther auf 5 Platten an 4 Tagen: 37 37,5 37 37,5; 39 39; 37,5 38 39; 33,5 34; 37.

Tabelle 4-3: hR_f'- und R_m'-Werte der Vergleichsstoffe in Toluol, Dichloräthan und Dibutyläther - geordnet nach der Elutionsfolge in Dichloräthan; Kieselgelplatten Woelm, rel. Luftfeuchte 50 %, rel. Wassergehalt der Fm etwa 50 %, ungesättigte S-Kammer

Vergleichsstoff	Toluol		Dichloräthan		Dibutyläther	
	hR_f'	R_m'	hR_f'	R_m'	hR_f'	R_m'
Kohlenwasserstoffe	100	$-\infty$	100	$-\infty$	100	$-\infty$
Menthofuran	98	-1,69	99	-2,00	100	$-\infty$
Anethol	79	-0,58	91	-1,00	95	-1,28
Citronellal	44	0,10	72	-0,41	81	-0,63
Menthylacetat	41	0,16	67	-0,31	87	-0,83
Linalylacetat	32,5	0,32	62	-0,21	82	-0,66
Geranylacetat	31	0,35	61,5	-0,20	80	-0,60
Eugenol	25,5	0,47	56	-0,10	60	-0,18
Methyleugenol	17,5	0,68	54,5	-0,08	49	0,02
Carvacrol	25,5	0,47	53,5	-0,06	84	-0,72
Pinocarvon	25	0,48	55	-0,09	68	-0,33
Menthon	27	0,43	50	0,00	79	-0,58
Zimtaldehyd	17,5	0,68	47,5	0,04	46	0,07
Citral	13,5	0,81	41	0,16	52,5	-0,04
Carvon	14,5	0,77	40,5	0,17	58,5	-0,15
Campher	16,5	0,71	38,5	0,20	55	-0,09
Pulegon	13,5	0,81	38	0,21	59	-0,16
Fenchon	11,5	0,89	30	0,37	57	-0,12
Pinocarveol	9	1,00	27,5	0,43	41	0,16
Linalool	8,5	1,03	27,5	0,43	49	0,02
Octen-3-ol-1	8,5	1,03	26,5	0,44	46,5	0,06
Cineol	12,5	0,85	26	0,45	64	-0,25
Piperiton	6	1,19	25,5	0,47	37,5	0,22
Menthol	7	1,12	24,5	0,49	43,5	0,11
Borneol	7	1,12			40	0,18
Anisaldehyd	15	0,75	24,5	0,49	37	0,23
Farnesol	6,5	1,16	24	0,50	36	0,25
Vanillin	4	1,38	19	0,63	14,5	0,77
Geraniol	5	1,28	18,5	0,65	29	0,39
Citronellol	5	1,28	18,5	0,65	33	0,31
Terpineol	4	1,38	16,5	0,71	28,5	0,40

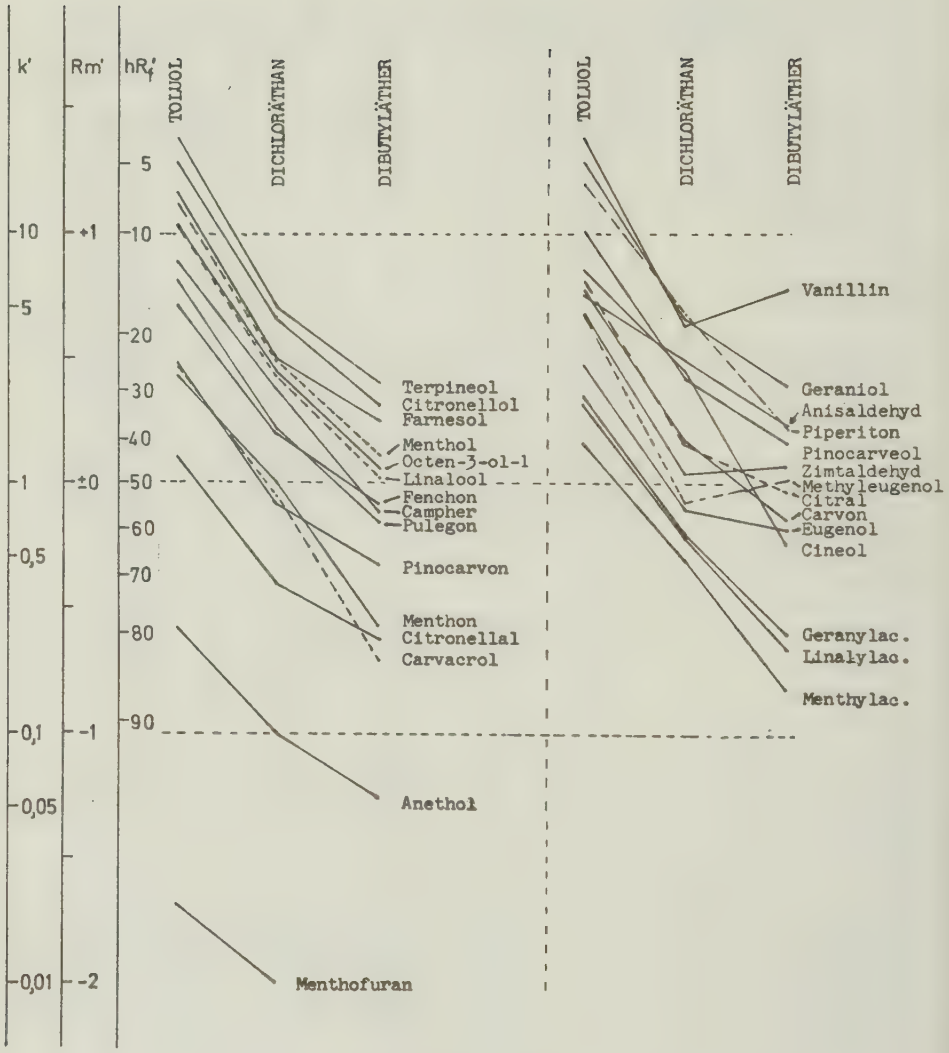


Abb. 4-1: R_m'-Werte der Vergleichsstoffe aus Tab. 4-3

4.2.4.2 Diskussion der Selektivität der Einkomponenten-Fm und der Möglichkeiten der HPLC-Bestimmung einzelner Komponenten

Aufgrund der gefundenen R_f'- bzw. R_m'-Werte sind folgende Aussagen möglich.

Die Kohlenwasserstoffe und Menthofuran lassen sich in allen Fm sehr gut abtrennen. Die übrigen untersuchten Inhaltsstoffe - sieht man von den Phenolen und Phenoläthern ab - liegen in allen Fm in einem R_m-Bereich von 1,1 bzw. 1,2, was einen k'-Bereich von z.B. 1 bis 12 bzw. 16 entspricht. In diesem Bereich ändern sie ihre relative Retention z.T. deutlich.

Die Verallgemeinerung, wonach sich die ätherischen Öle auf Kieselgel nach funktionellen Gruppen auftrennen[101,102], kann nicht bestätigt werden. Sie mag allenfalls bei einem Vergleich der Trennmechanismen der GC mit der LSC ihre Berechtigung haben. Bei den untersuchten sauerstoffhaltigen Terpenen liegen lediglich die R_m-Werte der Terpenalkohole und der Terpenester nahe beieinander und zeigen gleichsinnige Änderungen bei Fm-Wechsel. Die Carbonylverbindungen dagegen verteilen sich über einen ΔR_m-Bereich von 1,1 (Piperiton bis Citronellal) und ändern ihre relative Retention bei Fm-Wechsel. Ähnliches gilt für die phenolischen Verbindungen.

Die Retentionswerte der untersuchten Monoterpen- (oder auch ST-) Alkohole liegen in allen Fm in einem ΔR_m-Bereich kleiner 0,40, entsprechend einem Unterschied in der Selektivität von 2,5*). Dabei wandert der tertiäre Alkohol (Linalool) am höchsten und die sekundären Alkohole etwas höher als die primären. Die Auftrennung dieser Stoffe ist noch erschwert durch ihre Neigung auf Kieselgelplatten in diesen Fm langgezogene Flecke zu bilden.

---

*) Dies bedeutet, daß sich die k'-Werte um das 2,5-fache unterscheiden. Bei einer Trennstufenzahl von 1000 (mehr sind bei 10 cm Fleckwanderungsstrecke auf einer DC-Platte mit 30 µm-Trägermaterial kaum zu erwarten) und bei idealem Elutionsverhalten ließen sich zwischen dem obersten und dem untersten Stoff noch zwei Stoffe getrennt chromatographieren.

Eine bessere Auftrennung der Alkohole wäre nur denkbar bei gründlicher Änderung des chromatographischen Systems, z.B. durch 'Reversed-Phase'- oder Verteilungssysteme, die mehr nach der Kohlenstoffzahl der Substanzen trennen. Ein anderer Weg besteht in der Silylierung oder Acetylierung der Hydroxylgruppe, so daß andere Strukturmerkmale relativ stärker hervortreten, wie z.B. die Zahl und Stellung der Doppelbindungen - besonders bei Verwendung von mit Silbernitrat imprägnierten Trägern.

Die Möglichkeit, durch selektive Detektion einzelne Alkohole auch bei unvollständiger Trennung bestimmen zu können, ist in der HPLC nicht gegeben. Die bei den Terpenalkoholen in der Regel isolierten Doppelbindungen ergeben auch bei α,β-Stellung zur Hydroxylgruppe keine brauchbare molare Extinktion (Tab. 2-2). Eine HPLC-Bestimmung der Alkohole wäre also nur mit RI-Detektor und bei der großen Zahl der zu erwartenden Verbindungen nur mit sehr trennstarken Säulen denkbar. Da der RI-Detektor relativ schwer zu handhaben ist und trennstarke Säulen längere Analysenzeiten erfordern, erschien eine Bestimmung der Terpenalkohole nicht vorteilhaft.

Bessere Möglichkeiten für eine quantitative HPLC-Bestimmung bieten die aliphatischen Carbonylverbindungen. Sie liegen in ihren R_m'-Werten weiter auseinander. Fm-Änderungen lassen eher auf Änderung der relativen Retention hoffen (Abb. 4-1). Für die HPLC-Detektion ist diese Stoffgruppe interessant wegen der häufiger vorkommenden gut UV-absorbierenden Gruppen: C = O-Bindungen in Konjugation zu einer oder zwei C = C-Bindungen geben ε-Werte zwischen 4000 und 15000 bei λ_{max} zwischen 220 und 250 nm. Schließlich kommen Vertreter dieser Stoffgruppe in den zu untersuchenden Ölen relativ häufig vor, besonders in den Labiaten-Ölen.

Die stärksten Änderungen in der Fm-Selektivität beobachtet man bei den sauerstoffhaltigen aromatischen Verbindungen (Phenole, aromatische Aldehyde, Phenoläther). Zum Teil ergibt sich für diese Inhaltsstoffe eine andere eluotrope Reihe der verwende-

ten Fm. Nicht erklärlich war das chromatographische Verhalten von Eugenol und Methyleugenol (Eugenolmethyläther). In allen drei Fm wanderte das Phenol schneller als der Phenoläther; die umgekehrte Elutionsfolge war erwartet worden. Arbeiten der Literatur (von demselben Autor: Stahl[103-105]) zeigen zweimal Übereinstimmung und einmal keine Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen. Verwechslungen waren ausgeschlossen worden: Durch ^{1}H-NMR war sichergestellt worden, daß Inhalt und Kennzeichnung der Gefäße übereinstimmten.

Die gute UV-Absorption der sauerstoffhaltigen aromatischen Verbindungen würde eine bequeme und selektive HPLC-Detektion erlauben. Allerdings sind in den zu untersuchenden Ölen nur wenig Verbindungen aus dieser Stoffgruppe zu erwarten.

Überraschend ist schließlich das Retentionsverhalten des Cineols in den drei Fm. In Toluol und Dichloräthan wird Cineol ähnlich langsam wie die Alkohole eluiert, während es in Butyläther weniger zurückgehalten wird als die meisten anderen sauerstoffhaltigen Terpene. Diese Eigenschaft kann z.B. ausgenutzt werden, um die Nebenkomponenten im Eucalyptusöl zu bestimmen. Die kaum vermeidbare Überladung des Trägers durch Cineol wirkt sich weniger störend aus, wenn dieses vor den zu bestimmenden Komponenten eluiert wird; andernfalls würde Cineol die Nebenkomponenten vor sich herschieben oder überdecken.

Die beobachteten Selektivitätsunterschiede können überwiegend auf Wechselwirkungen zwischen Probensubstanz und mobiler Phase zurückgeführt werden, da angenommen werden kann, daß die verwendeten wenig polaren Einkomponenten-Fm die Eigenschaften der stationären Phase kaum verändern. Auch war darauf geachtet worden, daß der relative Wassergehalt von Sorbens und Fm nicht stark voneinander abwichen (50 % rel. Feuchte und 50 % rel. Wassersättigung der Fm).

Die gefundenen Fm-Selektivitäten lassen sich in etwa auf andere Lösemittel derselben Stoffgruppe übertragen.

4.2.4.3 Einfluß des dem Fm zugesetzten Anteils an Kohlenwasserstoffen auf die relative Retention

Die Annahme, daß gesättigte Kohlenwasserstoffe, die z.B. dem Fm zugemischt werden, um dessen Fm-Stärke herabzusetzen, in der LSC keinen Einfluß auf die Fm-Selektivität haben, also nur als "Verdünnungsmittel" wirken, kann durch die wenigen hierzu gemachten Versuche nicht bestätigt werden.

In den Gemischen Butyläther + Petroläther, a) 1 + 0, b) 1 + 1 und c) 1 + 3, sinkt der R_f-Wert des Menthol im Vergleich zum Piperiton mit steigender "Verdünnung" des Butyläthers bis er knapp unter dem des Piperitons liegt (Abb. 4-2).

Diese Versuche wurden in ungesättigten S-Kammern ohne Anwendung der Durchlaufchromatographie ausgeführt. Das heißt, es kann sich ein Fm-Gradient ausbilden, über dessen Stärke und Verlauf auf der DC-Platte nichts bekannt ist, und die R_f-Werte können nicht in R_m-Werte umgewandelt werden. Ungenauigkeiten ergeben sich auch aus den z.T. sehr kleinen Fleckwanderungsstrecken. Derartige Versuche sind daher besser auf Säulen auszuführen.

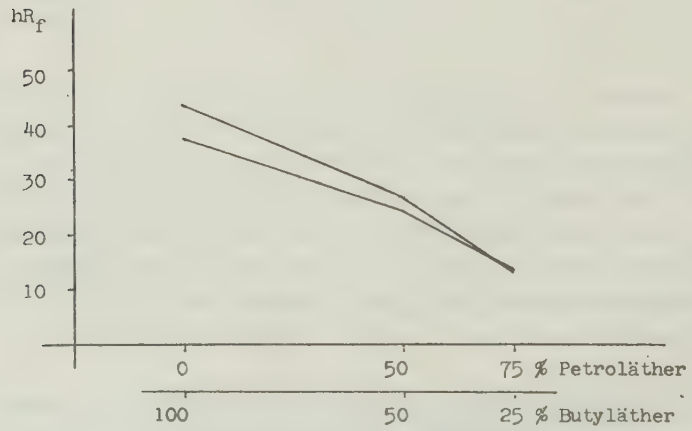


Abb. 4-2: hR_f-Werte von Menthol und Piperiton in Butyläther, dem unterschiedliche Mengen Petroläther 50-70° zugemischt waren; auf Kieselgelplatten Woelm, 50 % rel. F., ungesättigte S-Kammer.

4.2.4.4 Einfluß des Wassergehalts der stationären Phase auf die relative Retention

Für die Übertragung von DC-Trennungen auf die Säule war noch von Interesse, welchen Einfluß der Wassergehalt der stationären Phase (und damit auch der mobilen Phase) auf das Retentionsverhalten der verschiedenen Terpene hat. Dies läßt sich ebenfalls mit der DC schneller und einfacher untersuchen als mit der Säulenchromatographie, sofern Kammersysteme (z.B. Vario-KS-Kammer[89]) zur Verfügung stehen, die es gestatten, das Sorbens durch Kontrolle der rel. Luftfeuchte mit einer bestimmten Wassermenge vorzubeladen.

Abb. 4-3 gibt die R_m'-Werte der Vergleichsstoffe in Dichloräthan wieder. Der Wassergehalt des Kieselgels wurde über die Luftfeuchte der Kammern mit Schwefelsäure-Wasser-Mischungen kontrolliert und entsprach einer rel. Feuchte von 20, 50 und 80 %. Der Wassergehalt der Platten in Tab. 4-3, der mit der Feuchte der Raumluft im Gleichgewicht war (= 50 %, laut Hygrometeranzeige), dürfte verglichen mit den jetzt gefundenen R_m'-Werten nur etwa 40 % betragen haben. Die DCs wurden wie zuvor in ungesättigten S-Kammern entwickelt.

Es wurde nicht das Verhalten aller bisher verwendeten Inhaltsstoffe untersucht. Bei Komponenten, die ähnliches chromatographisches Verhalten gezeigt hatten (z.B. Alkohole), wurde angenommen, daß anhand weniger Vertreter jener Stoffgruppen Rückschlüsse auf die nicht mitchromatographierten Vergleichssubstanzen erlaubt sind.

Abb. 4-3 zeigt, daß die R_m'-Werte deutlich vom Wassergehalt der stationären Phase abhängig sind. Sie nehmen bei Änderung der rel. Luftfeuchte von 20 nach 80 % ähnlich stark ab wie bei der Änderung der Fm-Stärke von Toluol nach Butyläther (bei gleichbleibender rel. Luftfeuchte).

Die Änderungen der Selektivität waren wiederum bei den Phenolen (Eugenol und Carvacrol) am stärksten; mit zunehmendem Wassergehalt werden sie relativ stärker zurückgehalten. Das Retentionsverhalten des Eugenolmethyläthers zeigt dagegen wenig Abweichung von den Terpenen. Eugenol und Eugenolmethyläther weisen bei höheren Wassergehalten das theoretisch erwartete Retentionsverhalten auf: der Äther wandert schneller als das Phenol (siehe aber Abb. 4-1). Die Carbonylverbindungen und der Äther Cineol werden mit zunehmendem Wassergehalt relativ weniger zurückgehalten und dadurch beispielsweise besser von den Alkoholen abgetrennt. Geraniol und Menthol werden mit zunehmendem Wassergehalt schlechter getrennt. Um allerdings diese Beobachtung auf primäre und sekundäre Alkole ausweiten zu können, wären die R_m-Werte weiterer Vergleichssubstanzen notwendig. Menthylacetat wird mit zunehmendem Wassergehalt weniger zurückgehalten als die Carbonylverbindungen.

Verallgemeinernd kann gesagt werden, daß sich mit dem Wassergehalt nicht nur die Retentionskraft sondern auch die Selektivität eines chromatographischen Systems ändert. Es ist also möglich, nicht nur durch Fm-Wechsel, sondern bereits durch Änderung des Wassergehalts des Systems die relative Retention zweier Stoffe zu ändern. Während das Kleinerwerden der R_m-Werte mit zunehmender Wasserbelegung durch die Verringerung der Oberfläche des Sorbens erklärt werden könnte, dürften die Selektivitätsunterschiede auf die unterschiedliche Löslichkeit der Stoffe in der wässrigen stationären Phase zurückzuführen sein.

Für die HPLC ist wichtig,

- daß der Wassergehalt der mobilen Phase, über den in der Regel der Wassergehalt der stationären Phase kontrolliert werden muß, nur in engen Grenzen schwanken darf. Dabei dürfte die beabsichtigte Trennung der Carbonylverbindungen mit am wenigsten von Änderungen der Feuchte beeinflußt werden.
- daß es vorteilhaft ist, mit mittleren Wassergehalten zu arbeiten (etwa 30 bis 60 % rel. F.), da bei höheren Wassergehalten kleine Abweichungen relativ größere Änderungen der Selektivität bewirken, und weil die Beladbarkeit der sta-

tionären Phase bei höherem Wassergehalt sehr gering ist. (Es wurden bei 80 % rel. F. bei Probemengen von je 2 µg abweichende R_m-Werte gefunden, wenn mehr als eine Probensubstanz am gleichen Startpunkt aufgetragen wurden.) Ob eine andere polare stationäre Flüssigkeit (z.B. Alkohole), die eine bessere Löslichkeit für die Terpene besitzt, eine höhere Beladbarkeit und ähnliche Selektivitätsänderungen aufweisen, kann mit den experimentellen Möglichkeiten der DC nicht exakt genug untersucht werden.

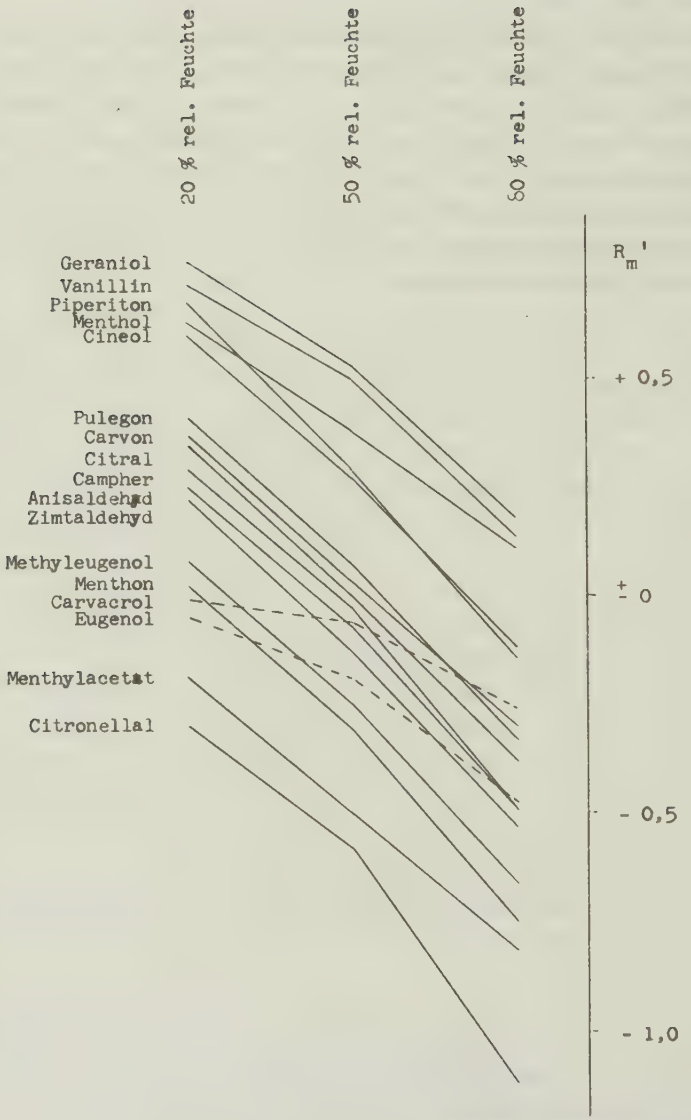


Abb. 4-3: R_m'-Werte einiger Vergleichsstoffe in Dichloräthan bei verschiedener Wasserbelegung des Kieselgels, entsprechend einer rel. Luftfeuchtigkeit von 20, 50 und 80 %; Kieselgelfertigplatten Woelm, ungesättigte S-Kammer.

4.2.5 Trennungen der ätherischen Öle

In den Einkomponenten-Fm war es nicht möglich, eine vollständige Auflösung für alle Komponenten zu erhalten. Dies trifft besonders auf die sich chromatographisch ähnlich verhaltenden Stoffe wie Alkohole oder Ester zu. Erschwert wird die Trennung der Öle oder die Identifizierung der Einzelstoffe durch die wegen Überladung der Schicht stark verbreiterten Zonen der Hauptkomponenten. Abb. 4-4 zeigt die in Dichloräthan erhaltenen Trennungen der vier Öle.

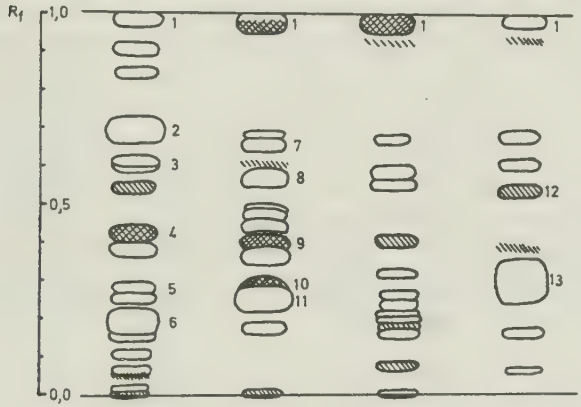


Abb. 4-4: DC von Melissenöl, Menthaöl, Pinusöl und Eucalyptusöl (v.l.n.r.); je 150 nl Öl, Kieselgel-Fertigplatten Woelm F 254/366, 40 % rel. F., Dichloräthan, ungesättigte S-Kammer,
Detektion: a) Fluoreszenzlöschung, schwach: einfach schraffiert, stark: kreuzweise schraffiert,
b) Vanillin-Schwefelsäure: umrandete Zonen,

1 = Kohlenwasserstoffe
2 = Citronellal
3 = Geranylacetat u.a. Acetate
4 = Citral
5 = Linalool
6 = Geraniol, Citronellol u.a. prim. Alkohole
7 = Menthylacetat
8 = Menthon
9 = Pulegon
10 = Piperiton
11 = Menthol
12 = Pinocarvon
13 = Cineol und Pinocarveol

4.2.5.1 Identifizierung von Inhaltsstoffen

Die in Abb. 4-4 bezeichneten Flecke konnten durch Vergleich der R_f-Werte mit den Reinsubstanzen, aufgrund des Verhaltens bei der Detektion (UV, Anfärbbarkeit) und aufgrund der aus der Literatur bekannten Zusammensetzung mit einiger Sicherheit zugeordnet werden. Dabei ist nicht ausgeschlossen, daß sich unter einer einheitlich erscheinenden Zone noch andere Substanzen verbergen.

In Tab. 4-4 sind die Nachweise zusammengefaßt, die zur Identifizierung der Stoffe führten. Bei fluoreszenzlöschenden Stoffen wurde als zusätzlicher Identitätsbeweis das Absorptionsmaximum der in-situ-Remissionskurven ermittelt. Auf die Beschreibung der mit Vanillin-Schwefelsäure erhaltenen Färbungen der Zonen wurde in der Tabelle verzichtet, da sich diese schlecht wiederholen lassen, so daß Vergleiche mit Literaturangaben nur begrenzt wertvoll sind. Für einige Stoffe, bei denen angenommen wurde, daß ihre DC-Bestimmung nicht gestört ist, wurde der ungefähre Gehalt im Öl durch visuellen Vergleich der Flecke mit ähnlich konzentrierten Vergleichsflecken ermittelt (halbquantitative Auswertung).

Tabelle 4-4: Inhaltsstoffe, die mit Hilfe der DC in den ätherischen Ölen identifiziert wurden

Verbindung	Rf in den drei Fm	Fluoreszenz-löschung	λ_{max} bei in situ Remissionsmessung	Farbe mit Vanillin/ Schwefelsäure	Literatur (s.Tab.2-1)	gefunden in ... (Gehalt)
Citronellal	+			+	+	Melissenöl (15%)
Geranylacetat	+			+	+	"
Citral	+	+	250 ± 5 nm	+	+	" (5%)
Linalool	+			+	+	"
Geraniol	+			+	+	"
Menthylacetat	+			+	+	Pfefferminzöl
Menthon	+			+	+	" (20-30%)
Pulegon	+	+	265 ± 5 nm	+	+	" (1%)
Piperiton	+	+	245 ± 5 nm	+	+	" (3-4 %)
Menthol	+			+	+	" (35%)
Menthofuran	-			-	+	" (0%)
Cineol	+			+	+	Eucalyptusöl (>70%)
Pinocarveol	+			+	+	"
Pinocarvon	+	+	252 ± 5 nm	+	+	"

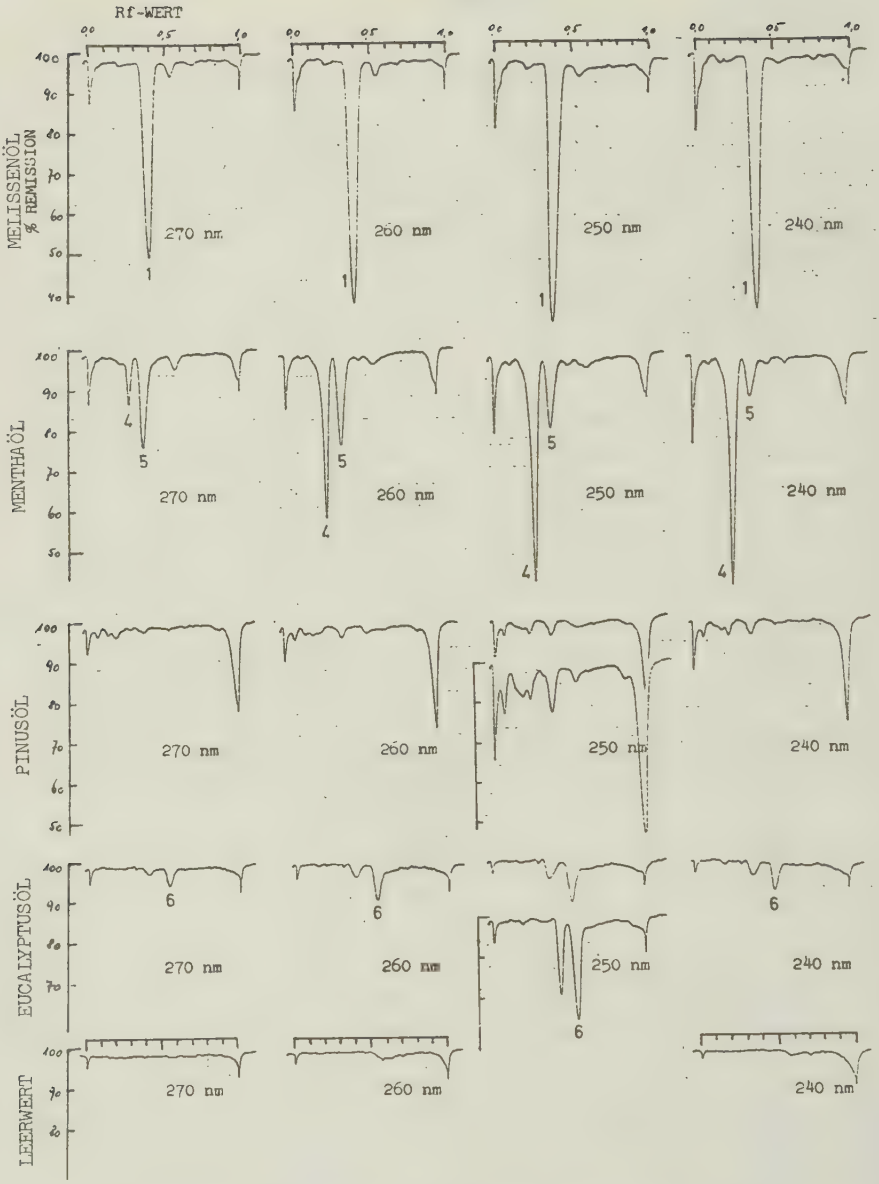
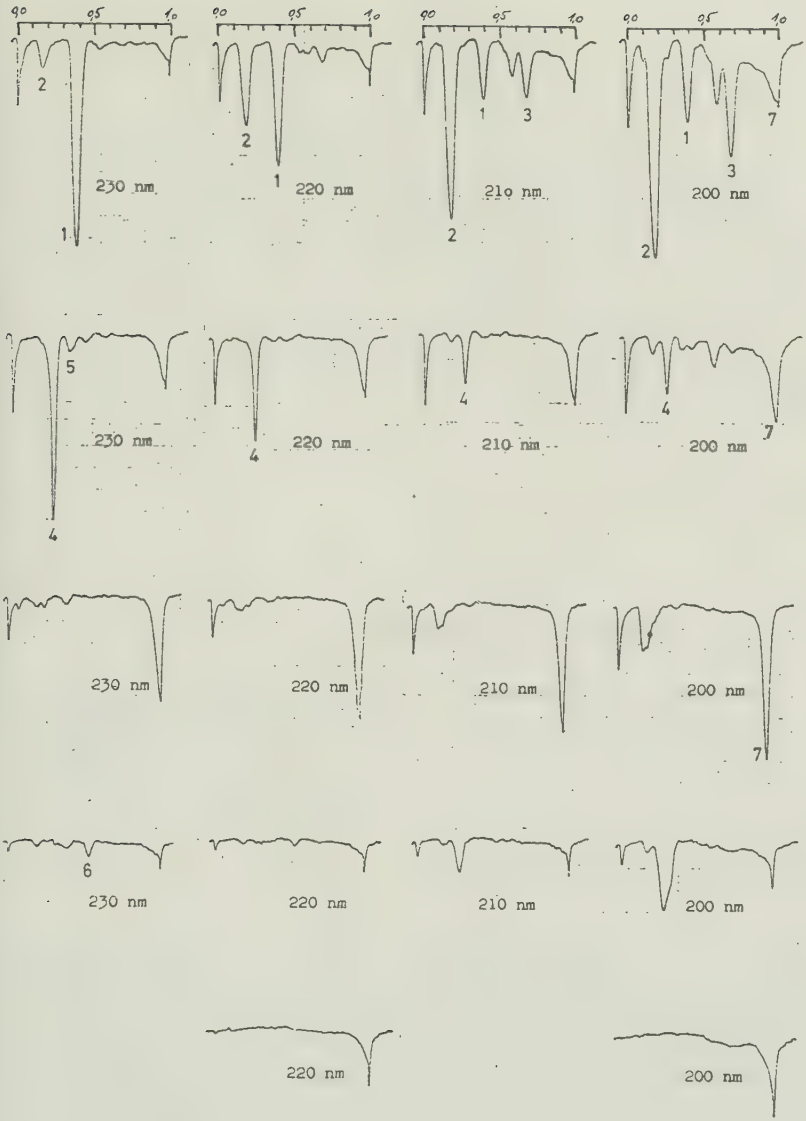


Abb. 4-5: Remissions-Orts-Kurven der DC der vier ätherischen Öle bei verschiedenen Wellenlängen;
Kieselgel 60 -Fertigplatten, Merck, ohne F 254, etwa 40% rel. Feuchte;
Fm: Dichloräthan, ungesättigte S-Kammer; je 150 nl Öl strichförmig (1 cm) aufgetragen, bei Pinusöl und Eucalyptusöl auch 600 nl bei 250 nm;
1 = Citral, 2 = ungesättigte Alkohole, 3 = Citronellal, 4 = Piperiton, 5 = Pulegon, 6 = Pinocarvon, 7 = ungesättigte Kohlenwasserstoffe



Teil der Abb. 4-5

4.2.5.2 UV-Remissions-Orts-Kurven

Einen besseren Eindruck von der UV-Absorption der Inhaltsstoffe als die Abb. 4-4 geben die Remissions-Orts-Kurven der DCs, die bei verschiedenen Wellenlängen erhalten wurden (Abb. 4-5). Es zeigt sich, daß die stärksten Absorptionen bei Wellenlängen größer 230 nm gefunden werden. Diese gehen auf α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen zurück, die in den einzelnen Ölen zu weniger als 5 % vorlagen. Sie bieten sich für eine HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion an; aber auch eine direkte photometrische Auswertung der DC-Schicht ist möglich, sofern die Terpene nicht zu flüchtig und auf dem trockenen Sorbens hinreichend stabil sind.

4.2.5.3 Fluoreszierende Inhaltsstoffe

Eine andere bequeme Detektion in der HPLC oder der direkten DC-Auswertung ist bei fluoreszierenden Verbindungen gegeben. Solche sind eventuell im Citronenöl, das dem Melissenöl des Handels zugemischt sein kann, zu erwarten. Gepreßte Citrusöle können Cumarine, Flavone oder Furocumarine als fluoreszierende Verbindungen enthalten[106].

Bei den eigenen Arbeiten wurden auf indikatorfreien Kieselgelschichten - auch nach Besprühen mit Alkalien - nur sehr schwach fluoreszierende Verbindungen bei 365 nm Anregungslicht gefunden. Diese blieben entweder am Start sitzen oder liefen mit der Fm-Front (Fm.: Dichloräthan). Es kann daher angenommen werden, daß es sich nicht um Terpene oder Phenylpropane mit nur einer sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppe handelt. Eine Bestimmung der ätherischen Öle anhand der fluoreszierenden Inhaltsstoffe erschien für die HPLC nicht aussichtsreich.

4.2.5.4 Zur Identität des Menthaöles

Das untersuchte Menthaöl kann aufgrund der DC-Ergebnisse nicht als offizinelle Ware gelten. Tab. 4-5 zeigt einen Vergleich der gefundenen Werte mit den Monographien einiger Arzneibücher. In diesem Vergleich stört weniger der etwas zu geringe Gehalt des Menthaöls an Menthol oder freien Alkoholen als vielmehr der hohe Gehalt an Piperiton und das Fehlen von Menthofuran. (Das Vorkommen von Menthofuran in Mentha-piperita-Ölen ist so typisch, daß darauf die Identitätsreaktionen einiger Arzneibücher beruhen, z.B. USP 1970, - auch wenn Mentofuran kein wertvoller Bestandteil ist und unangenehm riecht.)

Es handelt sich daher nicht um Öl von Mentha piperita, sondern vermutlich um japanisches Pfefferminzöl von Mentha arvensis[6,95]. Jene Öle enthalten sehr große Mengen an Menthol, das durch Kältebehandlung teilweise abgetrennt wird; die so behandelten Öle kommen als "entmentholisierte Öle" in den Handel.

Üblicherweise werden in den Ölen der beiden Mentha-Arten gefunden[7]:
in Mentha pip.-Öl: 0,5 - 1 % Piperiton, 2 - 7 % Menthofuran und 5 - 7 % Cineol;
in Mentha arv.-Öl: 1,5 - 5 % Piperiton, 0 % Menthofuran und wenig Cineol.

Durch diesen Befund wird die Allgemeingültigkeit der Untersuchungen etwas eingeschränkt, da Piperiton und Pulegon, die in diesem Öl gut mit UV detektiert werden können, in Mentha-pip.-Ölen durchaus fehlen können, während Menthofuran stets vorhanden sein soll. Menthofuran ließe sich im übrigen gut flüssigchromatographisch bestimmen, da es sich leicht von anderen Inhaltsstoffen abtrennen läßt (Abb. 4-1) und eine gute UV-Absorption besitzt, die eine spezifische Detektion ermöglicht.

Andrerseits ist dieser Befund ein Beweis, wie weitgehende Aussagen sich mittels der ungesättigteren, sauerstoffhaltigen Verbindungen machen lassen, obwohl diese nur in geringen Mengen vorkommen und für die pharmakologische Wirkung ohne Bedeutung sind.

Tabelle 4-5: Vergleich des untersuchten Menthaöles mit den Pfefferminzöl-Monographien verschiedener Pharmakopöen

	Analyse[a]	Ph.Eur[b]	DAB 7 (Komm.)[c]	Helv.1971[d]	USP 1970[e]
Menthol, freies	35 %	> 44 %	(52 %)	> 45 %	
Menthol, gesamt			> 48 %		50 %
Menthylacetat	+	4,5-10 %	4-12 %(5 %)	> 5 %	5 %
Ketone	+	15 -32 %			
Menthon	20-30 %	+	(22 %)	+	
Menthofuran	- (!)	+	(5 %)	+	+
Carvon	-	-		-	
Cineol	-	+		+	
Pulegon	1 %				
Piperiton	3-4 %				

a) DC-Ergebnisse, qualitativ und halbquantitativ

b) European Pharmacopoeia III (Englische Ausgabe), 1975, S. 272

c) H. Böhme und K. Hardtke, Deutsches Arzneibuch 7. Ausg. + Kommentar, Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart 1970, S. 1193

d) Pharmacopoea Helvetica VI, 1971, S. 1055

e) The Pharmacopeia of the United States of America, 18th Revision, 1970, S. 479

4.2.6 Zur quantitativen Beurteilung der DCs ätherischer Öle

Anhand der in Abb. 4-4 wiedergegebenen DC-Trennungen der ätherischen Öle ist es kaum möglich, einen richtigen Eindruck von der quantitativen Zusammensetzung der Öle zu erhalten, zumal dort auch sehr schwach detektierte Zonen eingezeichnet wurden. Aber auch das farbige Original erlaubt kaum bessere Aussagen, da die Intensität der Zonen wegen der unterschiedlichen Anfärbbarkeit mit Vanillin-Schwefelsäure wenig über die detektierte Stoffmenge aussagt. Auch sind einige Terpene mit diesem oder mit anderen Sprühreagenzien nicht nachzuweisen.

Hauptkomponenten lassen sich eventuell an Fleckverformungen durch Überladung der Schicht erkennen. Diese können jedoch auch durch nichtideales chromatographisches Verhalten eines Stoffes oder durch mehrere nicht getrennte Inhaltsstoffe verursacht sein. Vergrößerte Zonen finden sich schließlich auch bei sehr empfindlich nachweisbaren Stoffen.

Eine so wenig spezifische Detektion, wie die Messung des Brechungsindex in der Säulenchromatographie oder die Wärmeleitfähigkeitsmessung in der GC, kennt die DC für die Terpene nicht.

Halbquantitative Aussagen sind daher in der DC nur durch Vergleichen mit ähnlich konzentrierten Flecken der reinen Inhaltsstoffe möglich. Die dabei erreichbare Genauigkeit dürfte für die direkt auswertbaren UV-absorbierenden Inhaltsstoffe besser $\pm$ 5 % sein. Für Inhaltsstoffe, die erst nach einer chemischen Reaktion detektiert werden können, kommen noch die damit verbundenen Fehler hinzu, wie ungleichmäßiges Besprühen der Platte, nicht reproduzierbarer Ablauf der Reaktion u.a. Der relative Fehler dürfte für gut anfärbbare Stoffe bei $\pm$ 5 - 10 % liegen, bei schwer anfärbbaren, wie z.B. Menthon (mit Vanillin-Schwefelsäure) ist ein größerer Fehler zu erwarten.

Ein weiterer Nachteil in der quantitativen DC ist der geringe Bereich zwischen der Nachweisgrenze und der Überladung der Schicht. Dies gilt besonders für die DC ätherischer Öle, die häufig neben ein oder zwei Hauptkomponenten eine große Zahl von Nebenkomponenten enthalten. Um eine der Nebenkomponenten bestimmen zu können, muß daher die Schicht für die Hauptkomponente überladen werden. Dies führt zu zusammengeschobenen Zonen und abweichenden R_f-Werten, was sowohl bei der qualitativen wie der quantitativen Auswertung störend ist.

Schließlich besitzen die ätherischen Öl-Inhaltsstoffe große Dampfdrucke. Dies wirkt sich vor allem bei den Monoterpen-Kohlenwasserstoffen aus, die nicht nur leichter flüchtig sind, sondern auch infolge geringer sorptiver Kräfte am wenigsten vom Kieselgel festgehalten werden.

Ein Beispiel für die Möglichkeiten der quantitativen DC-Bestimmung von ätherischen Ölen in Ölgemischen anhand bestimmter Inhaltsstoffe möge die Trennung von Piperiton, Citral und Pulegon im Mentha- bzw. Melissenöl geben (Abb. 4-6). Bei direkter Auswertung durch UV-Remission, z.B. bei 240 nm, bleiben die meisten anderen Inhaltsstoffe unberücksichtigt (s.a. Abb. 4-5). Die Trennung der UV-absorbierenden Carbonylverbindungen ist jedoch anfällig gegen größere Mengen der langsamer wandernden Alkohole. Bei einer Laufstrecke von 10 cm wird z.B. bei der doppelten Auftragemenge die Piperiton-Zone vom nachfolgenden Menthol zusammengeschoben, so daß Fehler bei der Remissionsmessung nicht auszuschließen sind.

Die quantitative Bestimmung derselben Trennung mit Hilfe der HPLC ausgeführt hätte beispielsweise folgende Vorteile: geringere Streuung der Werte, keine systematischen Fehler durch Verdampfen von Analysensubstanz von der Platte, schonendere Behandlung der Terpene während der Trennung und der Detektion, keine Fehler durch zusammengeschobene Peaks.

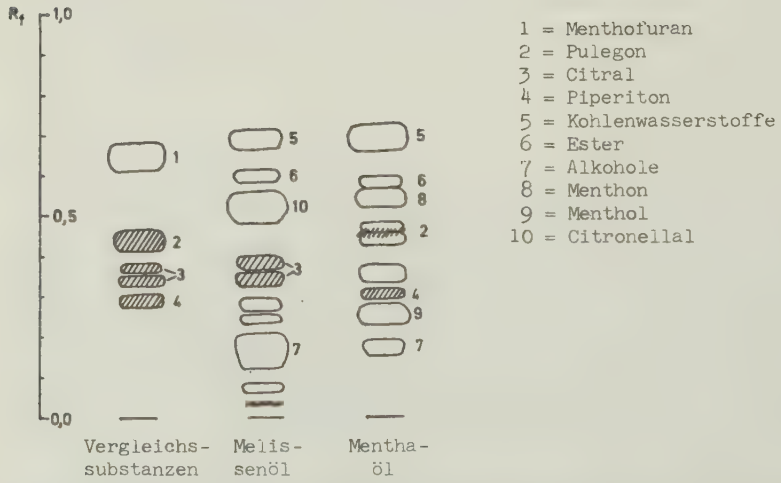


Abb. 4-6: Trennung der fluoreszenzlöschenden Carbonylverbindungen des Melissen und des Menthaöles;
je 7,5 nl Vergleichssubstanz und je 150 nl ätherisches Öl;
Kieselgel-Fertigplatten Woelm F 254/366, 50 % rel. Feuchte;
Isopropyläther + Petroläther, 50 + 50 (V/V), normalgesättigte N-Kammer;
Detektion: a) Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (schraffierte Zonen)
b) Vanillin-Schwefelsäure (umrandete Zonen)

4.2.7 Diskussion der DC-Untersuchungen

Anhand der DC-Untersuchungen war es einfacher und schneller möglich, einen Überblick über das chromatographische Verhalten der Terpene in Einkomponenten-Fm oder bei unterschiedlichen Wassergehalten des Kieselgels zu erhalten. Weniger zuverlässig waren dagegen Versuche zur Selektivität von petrolätherhaltigen Fm-Gemischen oder von unterschiedlich mit Alkohol vorbeladenem Kieselgel. Hierfür dürfte die Säulenchromatographie geeigneter sein.

Erfolgreich erwies sich die DC bei der Identifizierung von Öl-Inhaltsstoffen oder auch ätherischen Ölen. Hierbei waren besonders die Möglichkeiten von Vorteil, mehrere Zonen gleichzeitig zu detektieren oder mit verschiedenen Sprühreagenzien anfärben zu können. Auch infolge Überladung abweichende Retentionswerte sind auf der DC-Schicht leichter zu erkennen als in der Säulenchromatographie mit unspezifischen Detektoren. So wurde z.B. der am stärksten UV-absorbierende Peak des Menthaöles (Piperiton) erst mit Hilfe der DC richtig identifiziert. Auf den anfangs verwendeten HPLC-Säulen mit Kieselgel-Dünnschichtteilchen hatte die relativ große Menge des nicht UV-aktiven Menthols den Piperton-Peak nach kleineren Retentionszeiten verschoben, so daß dieser mit anderen möglichen UV-absorbierenden Inhaltsstoffen in Beziehung gebracht wurde.

Erwartungsgemäß ist es mit der weniger trennstarken DC bei derartigen Vielkomponenten-Gemischen schwer, die Einheitlichkeit einer Zone zu beurteilen - besonders bei den Alkoholen oder Estern. In einigen Fällen konnten jedoch aufgrund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit auch nicht getrennte Stoffe auseinandergehalten werden, so z.B. bei Myrtenal und Pinocarvon, die sich nicht trennen ließen, sich aber mit Vanillin-Schwefelsäure dunkelblau bzw. rosa färbten.

Schließlich läßt sich aufgrund der DC-Trennungen voraussagen, welche Inhaltsstoffe mit bestimmten HPLC-Detektoren nachweisbar sind. Da fluoreszierende Verbindungen in den untersuchten

Ölen praktisch fehlen, bieten sich für eine wenig störanfällige, spezifische und empfindliche HPLC-Detektion nur die UV-absorbierenden Inhaltsstoffe an. Die in Frage kommenden α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen besitzen genügend große ε-Werte, so daß sie auch in geringen Konzentrationen gut nachweisbar sind.

Die Genauigkeit und Richtigkeit einer quantitativen DC-Bestimmung der ätherischen Öle im Gemisch anhand bestimmter Einzelkomponenten wurde nicht untersucht. Die zuverlässigsten Ergebnisse wären bei einer Bestimmung der direkt auswertbaren UV-absorbierenden Verbindungen zu erwarten. An einem Beispiel wurde gezeigt, daß sich diese auch bei den kleinen Trennstufenzahlen der DC durch entsprechend selektive Systeme ausreichend trennen lassen.

4.3 Hochdruckflüssigchromatographie

4.3.1 Vergleich mit anderen LC-Methoden

Relativ spät in der etwa 80-jährigen Geschichte der Flüssigchromatographie wurden in den 60iger Jahren die Auswirkungen der langsamen Diffusionsgeschwindigkeit in Flüssigkeiten auf das chromatographische Ergebnis erkannt. Dies führte um 1969 u.a. zum Durchbruch der leistungsfähigsten LC-Methode, welche Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), schnelle Flüssigchromatographie (HSLC) oder auch moderne Flüssigchromatographie genannt wird. Die Bezeichnung HPLC hat die größte Verbreitung gefunden und wird im folgenden verwendet, - auch wenn andere Bezeichnungen das Wesentliche der neuen Methode besser charakterisieren.

Infolge der geringeren Diffusionskoeffizienten ist es in der LC mehr als in der GC notwendig, eng fraktioniertes Korn zu verwenden und dieses möglichst gleichmäßig in der Säule zu verteilen. Besonders aber müssen die Diffusionswege von einer "Sorptionsstelle" zu nächsten kürzer sein; d.h., keine zu tiefen

Poren des Trägermaterials bzw. dünne Filme der stationären Phase und kleine Zwischenräume zwischen den Partikeln. Durch kleinere Partikeldurchmesser werden diese Größen günstig beeinflußt.

In der Praxis hat sich gezeigt, daß Säulen mit Partikeln bis hinab zu 5 - 10 µm noch mit sinnvollem Aufwand zu füllen und zu handhaben sind. Mit kleinerem Korn steigen einmal die Säuleneingangsdrucke und damit die Anforderungen an die Konstruktion der Geräte (Pumpen, Dosiervorrichtung), zum anderen sind Korngrößen kleiner 10 µm schwer in der gewünschten engen Korngrößenverteilung ($d_p \pm 10$ %) zu erhalten und die Qualität der hergestellten Säulenpackungen ist weit mehr vom Zufall abhängig. Schließlich ist bei Säulen mit sehr feinen Teilchen die Reibungswärme größer, so daß ein radiales Temperaturgefälle in der Säule nicht ausgeschlossen wird.

Unter günstigen Bedingungen ist es in der HPLC möglich, Trennstufenhöhen zu erhalten, die nur das 2- bis 4-fache des Partikeldurchmessers betragen[107], d.h. für 5 µm Material Trennstufenhöhen von 10 bis 20 µm*). Häufig findet man jedoch in der Literatur Trennstufenhöhen mit dem 5- bis 10-fachen Korndurchmesser. Die Ursachen hierfür sind u.a. weniger gut fraktioniertes Säulenfüllmaterial und damit schlechtere Säulenpackungen, nicht ideale Verteilung der Probe auf dem Säulenkopf, größere Wanderungsgeschwindigkeiten der Zonen in der Nähe der Säulenwand oder zu große Totvolumina außerhalb der Säule.

Mit 1 m langen Säulen sind bei entsprechenden Vordrucken und langen Analysenzeiten Trennstufenzahlen um 100000 in der HPLC erreichbar[110]. Interessanter für Routine-Untersuchungen ist jedoch die Analysengeschwindigkeit (N_{eff}/t). Sie liegt für 30 µm Dünnschichtteilchen oder für 5 - 10 µm durch-und-durch poröse Teilchen im günstigen Fall bei etwa 10 N_{eff}/sec[111,112]. 25 N_{eff}/sec für 5 µm-Teilchen[107] dürften ein Optimum sein.

---

*) Ähnliches gilt für die HPTLC[108], die auf Impulse aus der HPLC zurückgeht, wo Trennstufenhöhen von 12 µm erreicht werden[109], - sofern man in der Flachbett-Chromatographie von Trennstufenhöhen sprechen darf.

Die Analysengeschwindigkeiten der HPLC sind also vergleichbar denen der GC, wo auf klassischen gepackten Säulen (mit 130 µm-Teilchen) 10 N_{eff}/sec erreicht werden[113]. Die Analysengeschwindigkeiten in der klassischen Säulenchromatographie für 150 µm Partikel sind etwa 0,02 N_{eff}/sec[113]. In der HPTLC ist die Analysengeschwindigkeit abhängig von der Frontwanderungsstrecke und dem R_f-Wert. Bei 3 cm Entwicklungsstrecke wurden bei mittlerem R_f Analysengeschwindigkeiten von 5 N_{eff}/sec gefunden[109].

Keine Unterschiede zu den traditionellen LC-Techniken, der konventionellen SC und der DC, gibt es bezüglich der Trennmechanismen. Die chromatographischen Bedingungen lassen sich jedoch in der HPLC besser reproduzieren und exakter beschreiben. So werden HPLC Analysen erst nach ausreichender Konditionierung der Säule durchgeführt und sind dann bei guter Kontrolle der Fm-Zusammensetzung über lange Zeiträume wiederholbar. Bei den traditionellen LC-Techniken wird die stationäre Phase in der Regel nur einmal verwendet und auf eine ausreichende Konditionierung häufig verzichtet. In der DC sind Konditionierungen über die Dampfphase möglich und bei gleichbleibender Kammerform, Vorbeladungszeit und Temperatur auch einigermaßen wiederholbar; über den Grad der Belegung sagen sie jedoch wenig aus. Schließlich kann sich in der DC bei Einkomponenten-Fm der Wassergehalt des Fm oder der stationären Phase mit der Wanderungsstrecke ändern; bei Mehrkomponenten-Fm bildet sich in der Regel ein Fm-Gradient aus, dessen Änderung mit der Wanderungsstrecke schwer zu beschreiben ist.

Eingeschränkt ist in der HPLC die Auswahl an Fm. Während bei den traditionellen LC-Techniken die Detektion meist nach Abtrennung des Fm erfolgt, wird in der HPLC die Probe fast immer im gelösten Zustand detektiert, d.h., die Fm müssen von der Probelösung abweichende Eigenschaften aufweisen, z.B. ausreichende UV-Durchlässigkeit oder möglichst unterschiedliche Brechungsindices. Außerdem werden in der HPLC wenig viskose Fm bevorzugt, um größere lineare Fließgeschwindigkeiten und

geringere Trennstufenhöhen zu erreichen. In den meisten Fällen ist es jedoch möglich, Fm mit ähnlicher Selektivität zu finden, die die jeweilige Detektion wenig stören, geringe Viskositäten haben, leicht zu reinigen und gut haltbar sind.

Neben der Entwicklung der Theorie und der Säulenfüllmaterialien mußten teilweise auch die apparativen Voraussetzungen für die HPLC geschaffen oder verbessert werden, wie z.B. Pumpen, die bei kleinem Fördervolumen und hohem Druck konstant und pulsationsfrei arbeiten, Probenaufgabesysteme, die bei hohen Drucken verwendbar sind, oder Detektoren mit kleinen Totvolumina. Besonders das Fehlen von einfach zu handhabenden, empfindlichen und unspezifischen Detektoren steht einer breiteren Anwendung der HPLC entgegen.

Für die Detektion der Inhaltsstoffe der 4 ätherischen Öle bietet sich der UV-Detektor an, der je nach Extinktionskoeffizient sehr empfindlich ist, aber nur wenige der Inhaltsstoffe anzeigt. Er ist gut zu handhaben und eignet sich für quantitative Bestimmungen. Die übrigen Inhaltsstoffe sind mit unspezifischen aber auch unempfindlicheren Detektoren nachzuweisen, von denen für die eigenen Untersuchungen ein Brechungsindex(RI)detektor zur Verfügung stand. RI-Detektoren reagieren relativ empfindlich auf Änderungen der Temperatur oder der Fm-Zusammensetzung und sind praktisch nur bei isokratischer Arbeitsweise einzusetzen.

4.3.2 Säulenchromatographie auf unpolarer stationärer Phase ("Reversed-Phase" Chromatographie)

4.3.2.1 Beschreibung des chromatographischen Systems

Wie sich bereits bei den Arbeiten auf Kieselgelplatten gezeigt hat, besitzen die Inhaltsstoffe der ätherischen Öle sehr verschiedene funktionelle Gruppen und chromatographische Eigenschaften, so daß für eine gleich gute Trennung aller Komponenten Gradientenelution wünschenswert ist.

Da das Rekonditionieren von Säulen mit polarer stationärer Phase, wie z.B. Kieselgel, sehr viel Zeit und Fließmittel erfordert, wurde zuerst versucht, in Reversed-Phase(RP)-Systemen zu trennen. Diese besitzen den Vorzug, daß Fm-Gradienten über einen großen Fm-stärken-Bereich schneller und besser wiederholbar auszuführen sind als in der normalen Säulenchromatographie (= auf polaren stationären Phasen). RP-Trägermaterialien werden zur Trennung der verschiedensten Stoffgruppen herangezogen, nicht zuletzt aufgrund der bequemen Einstellung und Aufrechterhaltung der Trennbedingungen. Unvergleichbar besser als auf polaren stationären Phasen können in RP-Systemen unpolare Verbindungen, wie Kohlenwasserstoffe, oder auch polare Verbindungen getrennt werden, die sich nur in der Zahl der Methyl- oder Methylengruppen unterscheiden.

Bei den RP-Trägermaterialien handelt es sich meist um Kieselgele, an die verschieden lange Kohlenwasserstoffreste (C_1 - C_{18}) über Si-C-Brücken chemisch gebunden sind. Als Fm werden in der Regel Gemische von wassermischbaren organischen Lösemitteln mit Wasser verwendet, besonders Acetonitril/Wasser und Methanol/Wasser.

Die eigenen Arbeiten wurden anfangs auf Vydac^{TM}-201-RP (C_{18}-KW-Kette) und später auf LiChrosorb^{R} RP-8 (n-Octyl-Reste) ausgeführt. Bei dem früher entwickelten Trägermaterial, Vydac-RP, handelt es sich um inerte, sphärische Glaskörper, 30 - 44 µm, die etwa 1 µm dick mit Kieselgel überzogen sind, an das die Kohlenwasserstoffreste chemisch gebunden sind. LiChrosorb RP-8 ist durch- und-durch poröses Kieselgel, dessen Hydroxylgruppen durch Octylsilyl-Reste ausgetauscht wurden.

Zur Erklärung des den RP-Trennungen zugrunde liegenden Mechanismus[114-123] werden van-der-Waalsche Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten des Trägers und den Kohlenwasserstoffgruppen der Probemoleküle angenommen. Die Wechselwirkungen zwischen Probenmolekül und stationärer Phase nehmen im allgemeinen in der folgenden Reihenfolge zu:

starke Lewissäuren (Carbonsäuren),
schwache Lewissäuren (Alkohole),
starke Lewis-Basen (Amine),
schwache Lewis-Basen (Äther, Aldehyde, Ketone),
permanente Dipole ($RCHCl_2$),
induzierte Dipole (CCl_4),
aliphatische Kohlenwasserstoffe.

Sicher müssen aber noch andere Kräfte zur Erklärung der Retention in diesen Systemen herangezogen werden[120], wie z.B. die Löslichkeiten der Probenmoleküle in der mobilen Phase.

Die zur Verwendung kommenden organischen Lösemittel können nach abnehmender Fm-Stärke etwa wie folgt geordnet werden[124-126]: THF > Isopropanol > Dioxan > Aceton > Acetonitril > Äthanol > DMFA > DMSO > MeOH > Äthylenglykol.

Mit zunehmendem Wasseranteil nimmt die eluotrope Kraft der Fm ab, dabei ist der Logarithmus der k'-Werte dem Wassergehalt des Fm etwa proportional (Abb. 4-7 und 4-8). Als Faustregel kann gelten - für die ätherischen Öl-Inhaltsstoffe -, daß Änderungen des Wassergehalts des Fm um 10 % die k'-Werte um etwa den Faktor 2 bis 3 verändern; Änderungen des Wassergehalts um 1 % bedingen Retentionszeitveränderungen von etwa 10 %. Sofern die organische Fm-Komponente gleich bleibt, ändert sich mit dem Wassergehalt des Systems die Fm-Selektivität meist nicht gravierend (s.a. Tab. 4-7).

Wegen der hohen Viskosität des Wassers und besonders der Mischungen aus Wasser und sauerstoffhaltigen Lösemitteln wird gerne bei erhöhter Temperatur gearbeitet. Dadurch werden die Wechselwirkungskräfte zur stationären Phase zwar geringer und die Retentionszeiten nehmen ab ($\log k' \sim 1/T$), doch verbessert sich die Beladbarkeit des Systems für die meisten Probesubstanzen und die theoretische Trennstufenhöhe wird kleiner[124]. Auf LiChrosorb RP-8 wurde bei einer Erhöhung der Säulentemperatur von etwa 22° auf 60° eine Abnahme der Retentionszeiten um das 2,5-fache beobachtet.

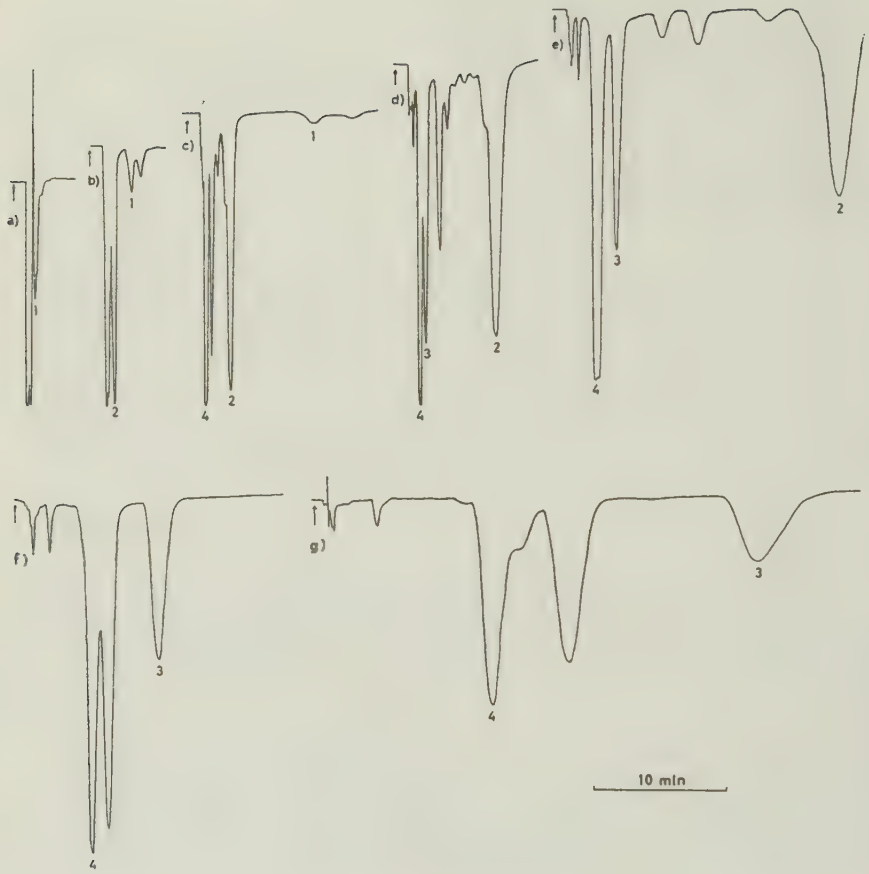


Abb. 4-7: Abhängigkeit der Retentionszeiten vom Methanolgehalt des Fließmittels;
je 5 µl einer 2 proz. Melissenöl-Lösung (in Methanol);
Vydac RP, 100 cm . 0,2 cm i.D.
Fm: a) 90, b) 80, c) 70, d) 60, e) 50, f) 40, g) 30 Vol-% Methanol (in Wasser), 1 ml/min;
UV, 210 nm, 0-100 % T.
(Die nummerierten Peaks beziehen sich auf Tab. 4-6 bzw. Abb. 4-8.)

Tabelle 4-6: Nettoretentionsvolumina, V_s, und k'-Werte der in Abb. 4-7 bezeichneten Peaks; Methanolgehalt der Fm wie in Abb. 4-7

a) Nettoretentionsvolumina, V_s, (ml)

Peak Nr.	1	2	3	4
Fm (a)	0,72			
(b)	2,3	0,9		
(c)	8,6	2,4		0,4
(d)		6,9	1,35	0,9
(e)		20,2	3,6	2,0
(f)			9,8	4,6
(g)			36,4	12,4

b) k'-Werte (V_m = 1,33 ml)

Peak Nr.	1	2	3	4
Fm (a)	0,54			
(b)	1,7	0,68		
(c)	0,5	1,8		0,3
(d)		5,2	1,0	0,7
(e)		15,2	2,7	1,5
(f)			7,4	3,5
(g)			27,4	9,3

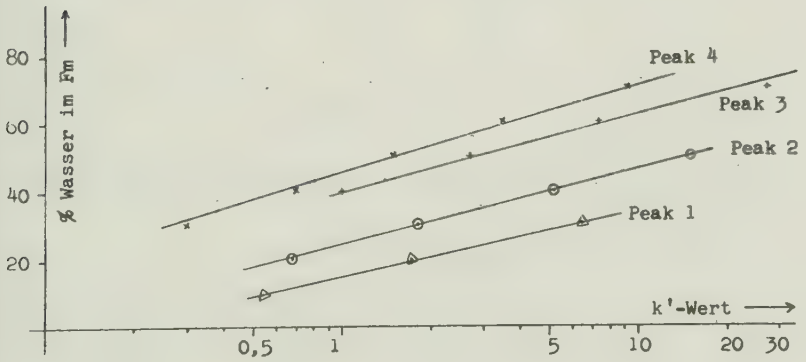


Abb. 4-8: k'-Werte aus Tab. 4-6 gegen den Wassergehalt des Fm aufgetragen.

4.3.2.2 Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe

Um die Selektivität des Systems C_8-silanisiertes Kieselgel/Wasser-Methanol kennenzulernen, wurden die k'-Werte einiger Vergleichsstoffe bei isokratischen Bedingungen ermittelt (Tab. 4-7).

Folgende Aussagen sind anhand dieser Tabelle möglich: Die Trennung erfolgt in geringerem Maße nach funktionellen Gruppen als in der normalen Flüssigchromatographie. Sehr groß ist der Einfluß der Methyl- und Methylengruppen. Monoterpen- und Sesquiterpenderivate werden bei gleichen funktionellen Gruppen sehr gut getrennt. Mit dem Grad der Sättigung nehmen die Retentionszeiten zu; aromatische und z.T. auch α,β-ungesättigte Verbindungen werden relativ früher eluiert. Mit der Fm-Stärke ändert sich nicht nur das Retentionsvolumen, sondern auch die Elutionsfolge der Stoffe. Zwar ist dieser Effekt nicht sehr groß, doch kann er bei schwer zu trennenden Substanzpaaren bedeutend sein. Die Selektivität nimmt allgemein mit zunehmender Fm-Stärke ab, z.B. für das Substanzpaar Citronellal/Piperiton von 3,2 auf 2,2, bei einer Änderung des Methanolgehalts des Fm von 40 % auf 60 %.

Die in ätherischen Ölen vorkommenden Stoffgruppen verlassen in etwa folgender Reihenfolge die Säule:

- Phenole (C_9),
- Monoterpenalkohole, -äther, -aldehyde, -ketone,
- Phenoläther (C_{10}),
- Monoterpenkohlenwasserstoffe, sauerstoffhaltige Sesquiterpene,
- Sesquiterpenkohlenwasserstoffe.

Tabelle 4-7: k'-Werte einiger Vergleichsstoffe, geordnet nach Stoffklassen und steigender Retention; LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm x 0,3 cm i.D., V_m = 1,40 ml; 60° C Säulentemperatur; 2 ml/min; 40, 50, 60 und 70 Vol. % Methanol in Wasser

	40 %	50 %	60 %	70 %
Eugenol	4,6	1,9	0,9	
Methyleugenol	9,6	3,6	1,5	
Carvacrol	10,0	4,1	1,6	
Anethol	16,2	5,8	2,4	
Octen-3-ol-1	9,2	3,7		
Borneol	11,6	4,5	1,9	
Terpineol	11,4	4,6	1,9	
Geraniol	15,9	5,4	2,1	
Citronellol	15,4	5,4	2,1	
Linalool		5,4	2,1	
Menthol	22,3	7,4	2,7	
Neomenthol	25,6	8,8	3,1	
Farnesol			10,7	3,4
Piperiton	7,4	2,9	1,3	
Carvon	6,6	3,0		
Citral a	10,6	3,9	1,7	
Citral b	12,5	4,5	1,85	
Pulegon	10,4	4,1	1,8	
Menthon	16,2	6,1	2,4	
Citronellal	23,6	7,8	2,8	
Cineol	12,1	5,2	2,1	
Menthofuran			4,4	1,9
Menthylacetat			6,9	
p-Cymol			4,9	2,0
Myrcen			7,6	2,9
Camphen			7,6	3,1
Phellandren			7,8	3,1
Limonen (Dipenten)			8,0	3,15
Caren			8,6	3,4
α-Pinen			9,5	3,6
Pinan			12,7	4,6
Caryophyllen				10,0

4.3.2.3 Trennungen der 4 ätherischen Öle und Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung

Die Abb. 4-9a, b und c geben die Trennungen der 4 ätherischen Öle bei UV-Detektion wieder. Hierbei wurde nicht die Extinktion des Eluats, sondern die Transmission gemessen. Dies erwies sich als bequemer, da kleine Peaks relativ größer erscheinen, große Peaks aber die Schreiberbreite nicht übersteigen, so daß die Registrierempfindlichkeit während einer Analyse nicht verändert werden muß. Allerdings sind größere Peaks aufgrund der nichtlinearen Aufzeichnung unförmig, und die Auflösung zweier solcher Peaks ist scheinbar schlechter (Abb. 4-10). Der gewählte lineare Gradient ist allen anders geformten Gradienten (konkav, konvex oder stufenförmig) überlegen. Dies wurde experimentell ermittelt und ergibt sich auch aus der Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Retentionsvolumens und dem Wassergehalt des Fließmittels (s.o.). (Ähnliche Verhältnisse findet man in der GC, wo der Logarithmus des spezifischen Retentionsvolumens der Temperatur umgekehrt proportional ist.) Die lineare Zunahme der Fm-Stärke hat den Vorzug, daß die Peaks von reinen Substanzen alle gleich breit eluiert werden, so daß aufgrund der Peakbreite Rückschlüsse auf deren Einheitlichkeit möglich sind - sofern bei konstantem Durchfluß weder die Säule noch der Detektor überladen ist.

Die Abb. 4-9a und 4-9b zeigen die bei 215 und 235 nm in den vier Ölen detektierten Komponenten. Auf die Wiedergabe der Chromatogramme bei anderen Wellenlängen wurde verzichtet, zumal sich für die sauerstoffhaltigen Terpene ähnliche relative Absorptionen ergeben wie bei den in der DC gezeigten Remissions-Orts-Kurven (Abb. 4-5) - unter Berücksichtigung der auf Kieselgel beobachteten bathochromen Verschiebung um etwa 10 nm gegenüber den Lösungsmittelspektren in Äthanol. Stattdessen sind in Abb. 4-9a die Absorptionsmaxima größer 220 nm der betreffenden Peaks angegeben. (Diese wurden ermittelt anhand der nach der Säule gesammelten Fraktionen in 0,2 cm x 1 cm Küvetten. Probemenge: je 500 nl Öl. Das UV-Lösemittel ist das den einzelnen Fraktionen entsprechende Methanol/Wasser-Gemisch.)

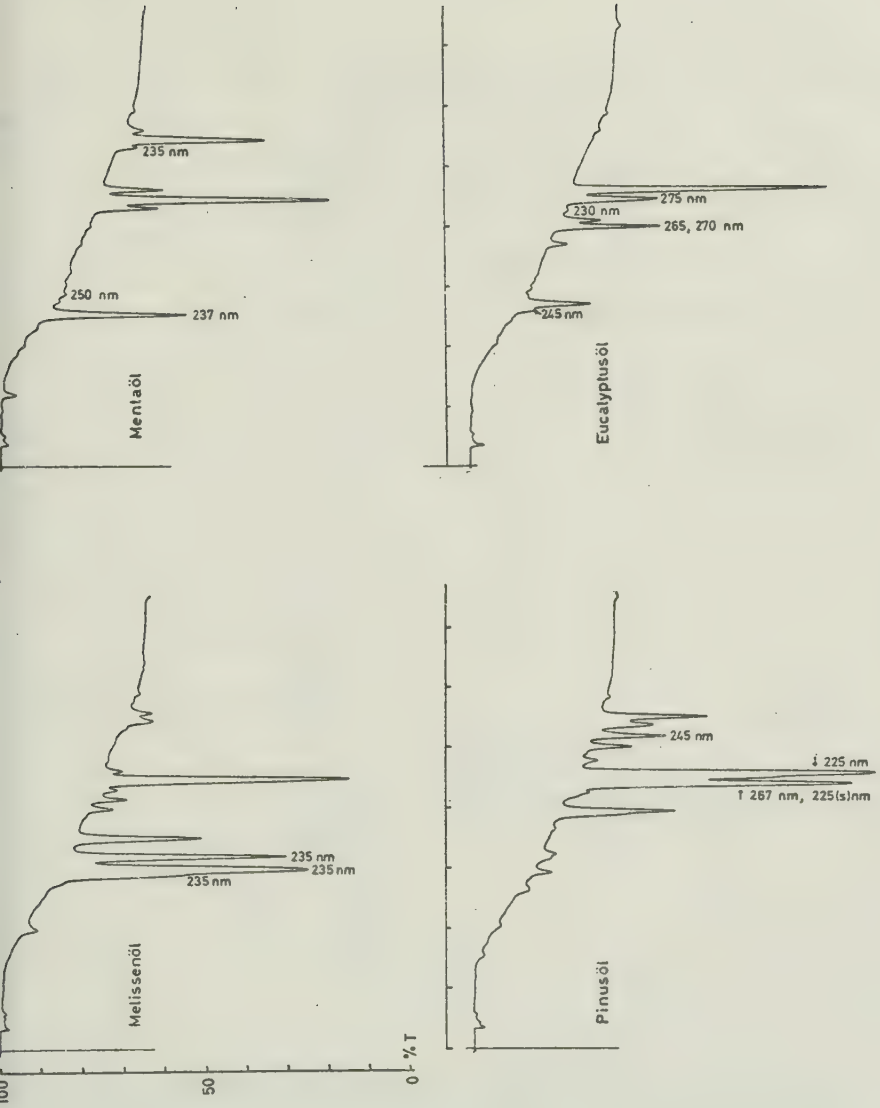


Abb. 4-9a: Trennungen der vier ätherischen Öle;
je 5 µl der 2 proz. Öllösungen (in Methanol); LiChrosorb RP-8, 10 µm,
25 cm . 0,3 cm i.D.; 60° Säulentemperatur; Fm: 1 min bei 40 % Methanol
(in Wasser), von 40 % auf 95 % Methanol in 10 min, 2 ml/min;
UV 215 nm, 0-100 % T.

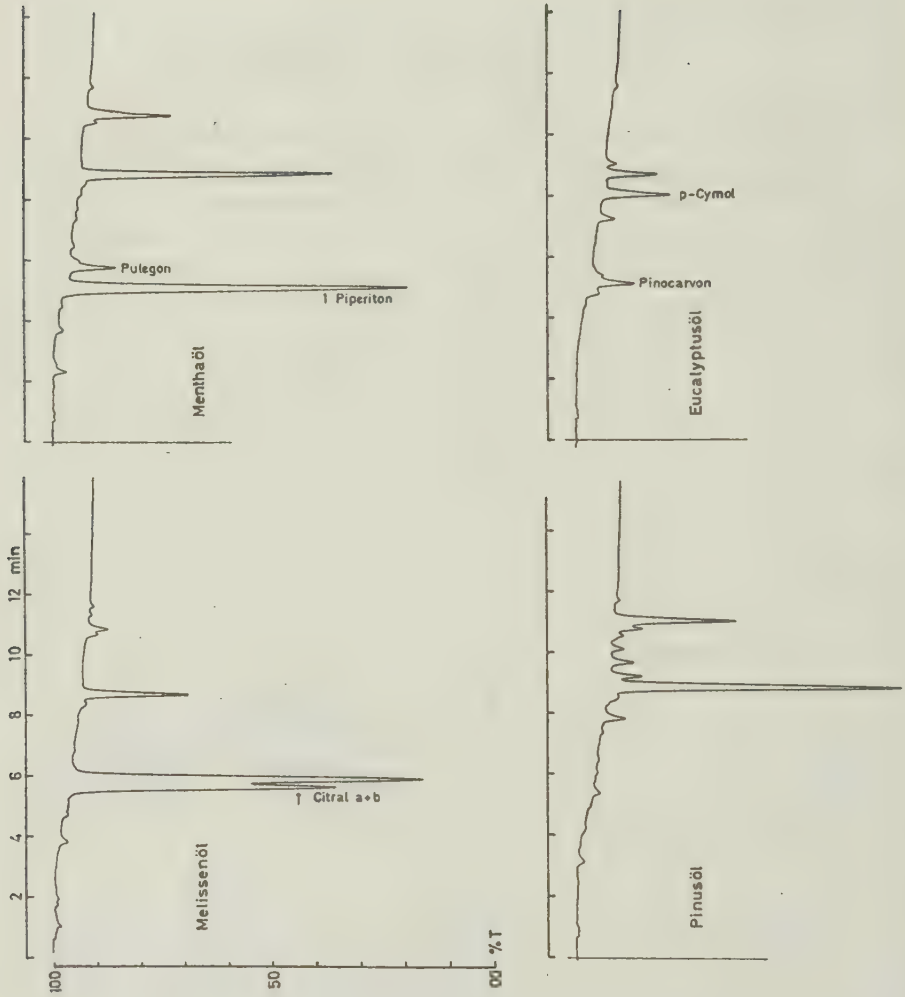


Abb. 4-9b: Bedingungen wie in Abb. 4-9a, jedoch Detektion bei 235 nm.

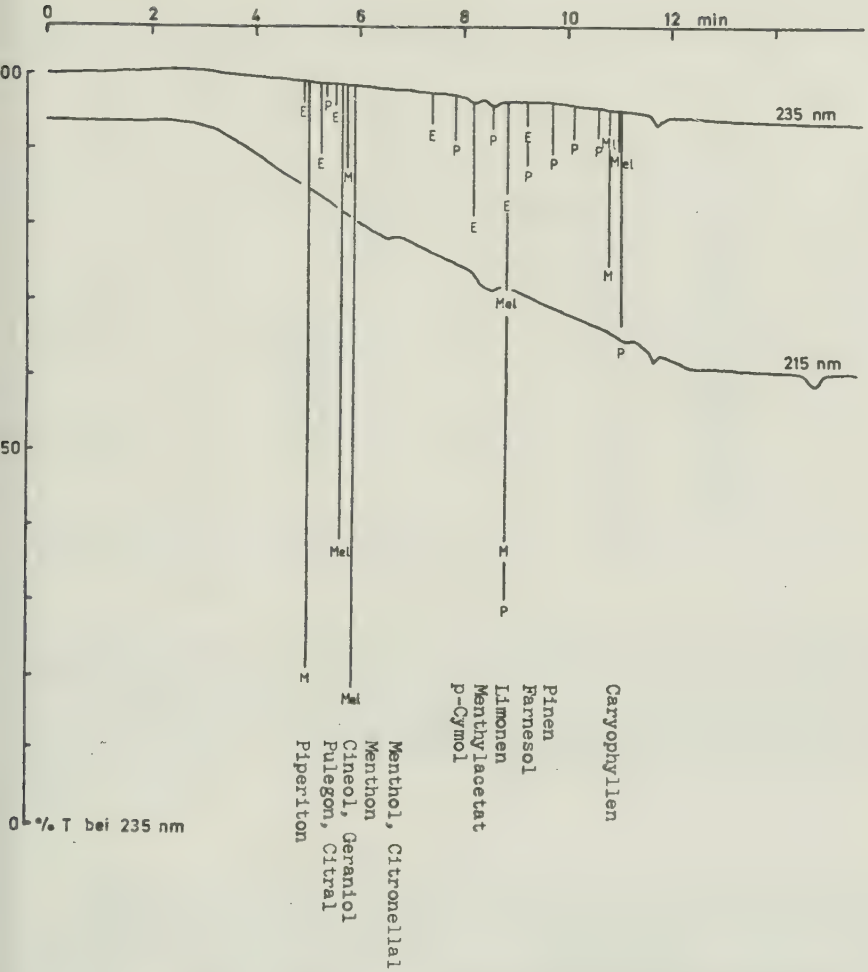


Abb. 4-9c: Schematische Wiedergabe der Retentionszeiten und der Peakhöhen bei 235 nm (aus Abb. 4-9b) der Inhaltsstoffe der vier ätherischen Öle. Daneben die Transmission des reinen Fließmittels bei 215 und 235 nm. Mel = Melissenöl, M = Menthaöl, P = Pinusöl, E = Eucalyptusöl.

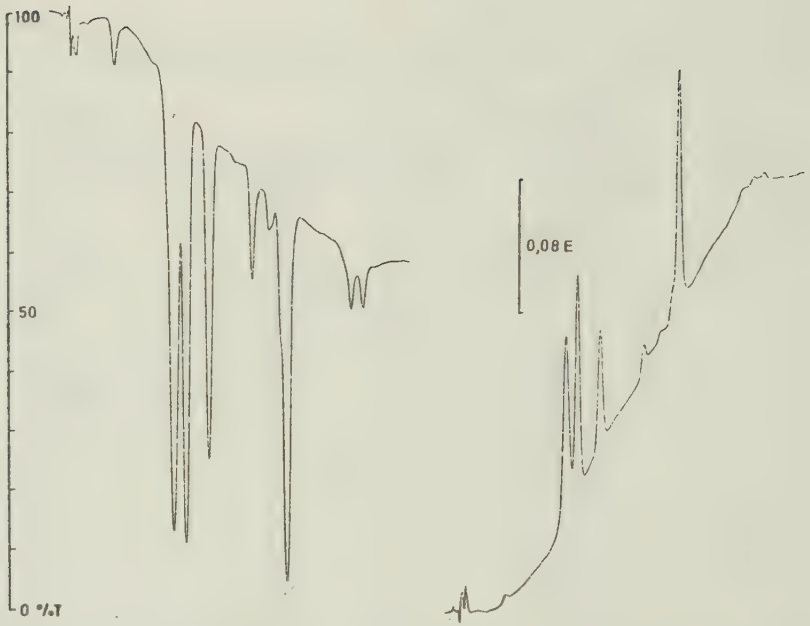


Abb. 4-10: Vergleich derselben Trennung bei Anzeige der UV-Transmission (links) und der UV-Extinktion (rechts); je 5 µl einer 2 proz. methanolischen Melissenöl-Lösung; Vydac RP, 100 cm . 0,2 cm i.D.; Säulentemperatur 60°; 1 min bei 35 % (V/V) Methanol, von 35 nach 85 % Methanol in 15 min und 3 min bei 85 % Methanol in Wasser; 1 ml/min; UV 215 nm, 0-100 % T bzw. 0-0,4 E.

In Abb. 4-9b sind diejenigen Peaks bezeichnet, die aufgrund der bisherigen Kenntnisse, aufgrund der im reversed-phase System mit den Vergleichsstoffen identischen Retentionszeiten und aufgrund der UV-Maxima zugeordnet werden können.

Abb. 4-9c zeigt den Verlauf der Grundlinie für den verwendeten Fm-Gradienten bei 215 und 235 nm, wenn keine Probe aufgegeben wird. Die detektierten Peaks sind auf UV-aktive Verunreinigungen der Lösemittel (des Wassers) zurückzuführen und kehren in allen Chromatogrammen in ähnlicher Größe wieder. Die bei 235 nm absorbierenden Inhaltsstoffe der vier Öle (aus Abb. 4-9b) wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Retentionsvolumina in Abb. 4-9c schematisch eingezeichnet. Außerdem wurden

zur besseren Anschaulichkeit mit Hilfe der Tab. 4-7 angegeben, bei welchen Retentionszeiten jene Vergleichsstoffe bei diesem Fm-Gradienten etwa eluiert werden würden.

Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung a) bei UV-Detektion

Aus Abb. 4-9c und Tab. 4-7 geht hervor, daß die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen, die sich wegen ihrer guten UV-Absorption für eine spezifische photometrische Detektion eignen würden, sehr wenig getrennt sind. Dies bedeutet, daß die quantitativen Bestimmungen von Melissenöl und Pfefferminzöl in Öl-Gemischen mit Hilfe der Inhaltsstoffe Citral bzw. Piperiton mit einem Fehler durch unvollständig abgetrennte kleinere Peaks behaftet sind. Dieser Fehler läßt sich etwas verringern durch Detektion bei Wellenlängen, die kleinere relative Extinktionen für die störenden Komponenten ergeben, etwa bei 225 nm.

Abb. 4-11 verdeutlicht dies an den Extinktionskurven von Citral, Piperiton und Pulegon in Methanol. (Die bei ähnlichen Retentionszeiten eluierte bei 235 nm detektierte Komponente des Eucalyptusöles (Pinocarvon, Abb. 4-9b) hat ihr Maximum bei etwa 240 nm.)

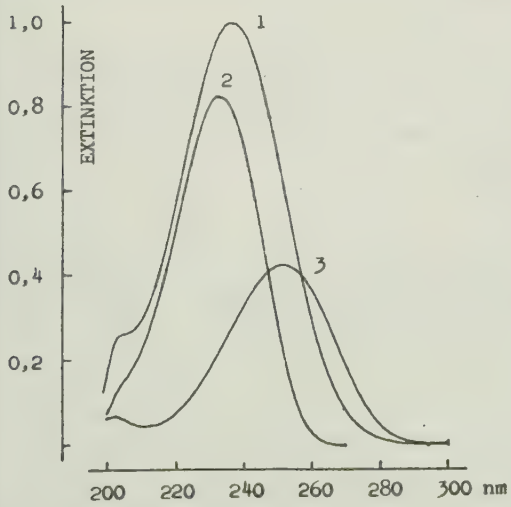


Abb. 4-11:

UV-Absorptionskurven einiger Carbonylverbindungen in Methanol,
1 = Citral
2 = Piperiton
3 = Pulegon
(ε -Werte der Substanzen im experimentellen Teil)

Eine bessere Unterscheidung als bei den sauerstoffhaltigen, UV-aktiven Terpenen scheint im RP-System für die Kohlenwasserstoffe gegeben zu sein (Abb. 4-9a, b und c). Abb. 4-12 zeigt bei verschiedenen Wellenlängen die Trennungen besonders der Kohlenwasserstoffe der vier Öle. Man erkennt, daß die besser UV-absorbierenden Kohlenwasserstoffe (Aromaten oder α,β-ungesättigte Terpene) entweder in mehreren Ölen vorkommen oder sehr ähnliche Retentionszeiten besitzen. Die Möglichkeiten durch Änderung der Wellenlänge einzelner Öle im Gemisch der Öle seketiv zu bestimmen, sind gering. Aromatische Kohlenwasserstoffe, die noch bei relativ langen Wellenlängen UV absorbieren, besitzen für jene Maxima sehr geringe ε-Werte (Tab. 2-2) und kommen in den untersuchten Ölen nur in geringer Menge vor. p-Cymol z.B., ein in ätherischen Ölen häufig zu findendes Artefakt, kommt im Eucalyptusöl zu 1,5 % und im Pinusöl zu 2,5 % vor. (Als Beweis für die Identität des p-Cymols wurde nur die Retentionszeit im RP-System und die UV-Absorptionsmaxima der entsprechenden LC-Fraktion verwendet.) Die α,β-ungesättigten Kohlenwasserstoffe besitzen zwar brauchbare ε-Werte, kommen jedoch in mehreren ätherischen Ölen vor und sind im RP-System teilweise schwer voneinander oder von den MT-Estern zu trennen (s.a. Tab. 4-7). Allenfalls bietet sich von den Kohlenwasserstoffen die am stärksten zurückgehaltene Komponente des Pinusöls - vermutlich ein ungesättigter Sesquiterpen-KW - für die Bestimmung dieses Öles im Gemisch aller Öle an (Abb. 4-12).

Wegen der geringen Trennmöglichkeiten der KW und aus den oben erörterten Gründen (3.2. und 4.2.3.1.) wurde in der HPLC - wie auch in der GC und DC - auf die Bestimmung einzelner Vertreter dieser Stoffgruppe verzichtet.

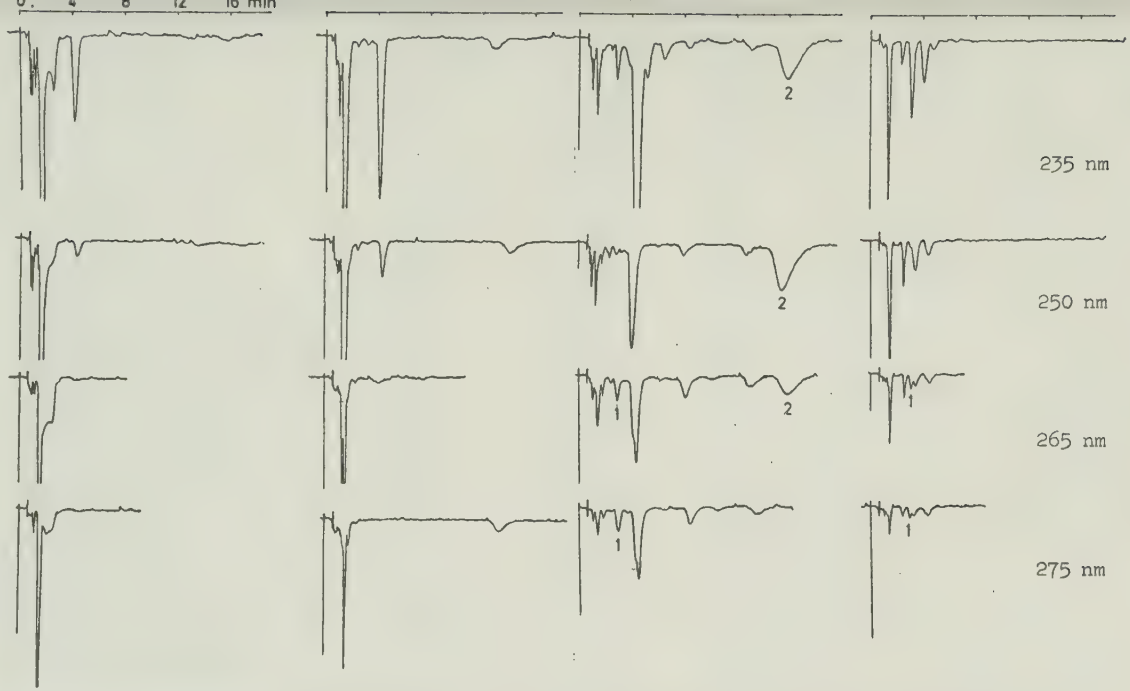


Abb. 4-12: Trennungen der Kohlenwasserstoffe der 4 ätherischen Öle bei verschiedenen Wellenlängen; je 5 µl der 5 proz. Öllösungen (in Methanol); LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D., 60° Säulentemperatur; Fm: Methanol + Wasser, 65 + 35 (V/V); UV: 0-100 % T, Wellenlängen wie angegeben;
1 = Cymol, 2 = ein Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff

Ebenso erschien vorerst die quantitative Bestimmung der sauerstoffhaltigen Terpene im Gemisch aller 4 Öle mittels UV-Detektion in dem RP-System nicht vorteilhaft,

a) da ihre vollständige Trennung nur bei großen k'-Werten (s. Tab. 4-7 und Abb. 4-7g) u n d bei hohen Trennstufenzahlen möglich ist*),

b) da von der normalen Chromatographie auf Kieselgel (siehe DC) eine bessere Trennung erwartet wird, zumal jene mehr Möglichkeiten bietet, die Fm-Selektivität zu verändern,

c) da in der normalen Chromatographie aufgrund der allgemein niedrigeren Fm-Viskositäten mehr Trennstufen pro Druck und pro Zeit erreichbar sind,

d) da die z.T. ähnlich UV-absorbierenden Kohlenwasserstoffe um ein Vielfaches später eluiert werden und diese erst abgewartet werden müßten, ehe die nächste Analyse auf die Säule gegeben wird,

e) da die Haltbarkeit der Probelösungen in den notwendigerweise polaren Lösemitteln sich als gering erwies: beobachtet an methanolischen Citral-Lösungen (s. 3.3.1).

---

*) Berechnung der theoretisch erforderlichen Trennstufenzahlen, N, für einige Substanzpaare bei einer Auflösung von R_s = 1,5 (Grundlinientrennung) nach der Gleichung z.B.[36]:

$$R_s = \frac{\alpha-1}{4\alpha} \cdot \frac{k'}{1+k'} \cdot \sqrt{N}$$

unter Verwendung der k'-Werte aus Tab. 4-7:
für Citral a und b in 40 Vol. % Methanol:
k'_1 = 10,6, k'_2 = 12,5; α = 1,18; N = 1800,
für Citral a und b in 50 Vol. % Methanol:
k'_1 = 3,93, k'_2 = 4,5; α = 1,14; N = 3350,
für Pulegon und Citral a in 50 Vol. % Methanol:
k'_1 = 3,93, k'_2 = 4,14; α = 1,05; N = 21900
(das letztgenannte Substanzpaar wird bei geringerer Fm-Stärke (40 Vol. % Methanol) nicht besser getrennt.
So hohe Trennstufenzahlen (20000) sind auch mit bestens gepackten RP-Säulen bei günstigeren Trennbedingungen (geringere Fließgeschwindigkeit, geringere Fm-Viskosität) mit 25 cm langen Säulen nicht erreichbar. Die erforderlichen längeren Säulen würden große Analysenzeiten ergeben, die bei Routineanalysen unerwünscht sind.

Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung b) bei RI-Detektion

Schließlich interessierten für das RP-System die Möglichkeiten der Detektion mittels Brechungsindex (RI). Einmal um einen ungefähren Eindruck von der mengenmäßigen Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen zu erhalten, zum anderen, um zu sehen, inwieweit die RI-Detektion für Bestimmungen einzelner Inhaltsstoffe im Einzelöl oder im Gemisch der Öle geeignet ist.

Da der RI-Detektor praktisch nur bei isokratischen Bedingungen verwendet werden kann, wurde für die Chromatogramme in Abb. 4-13a eine Fm-Stärke gewählt, die mit Rücksicht auf die Analysendauer die früh eluierten Stoffe relativ schlecht auflöst. (Zum Vergleich der Auflösung bei verschiedenen Fm-Stärken kann Abb. 4-7 herangezogen werden.)

Wegen des großen Volumens des RI-Wärmeaustauschers (etwa 100 µl) wurde der RI-Detektor hinter dem UV-Detektor angeordnet. Bei den gewählten Bedingungen (Durchflußrate 2 ml/min) wurden für denselben Peak bei UV-Detektion 1800 und bei RI-Detektion 1600 Trennstufen ermittelt; d.h. die Auflösung der Peaks ist im UV-Detektor etwas besser, auch wenn die abgebildeten T r a n s m i s s i o n s kurven das Gegenteil vermuten lassen. Bei geringeren Durchflußraten oder bei Teilung des Eluensstromes zwischen dem UV- und dem RI-Detektor wurden noch weniger Trennstufenzahlen für RI-detektierte Peaks gefunden.

Die Chromatogramme in Abb. 4-13a zeigen, daß die UV-Detektion auch nicht bei kurzen Wellenlängen (210 nm) einen Eindruck von den getrennten Stoffmengen geben kann. Dagegen stimmen die bei RI-Detektion gefundenen Peakflächenprozente eher mit der prozentualen Zusammensetzung der Öle überein. Dies zeigte sich bei den später beschriebenen quantitativen Bestimmungen, z.B. von Cineol im Eucalyptusöl: Der Peakflächenanteil des Cineols bei RI-Detektion betrug 78,9 Meßwert-%, durch externe Eichung wurden 78,9 % (G/G) Cineol gefunden.

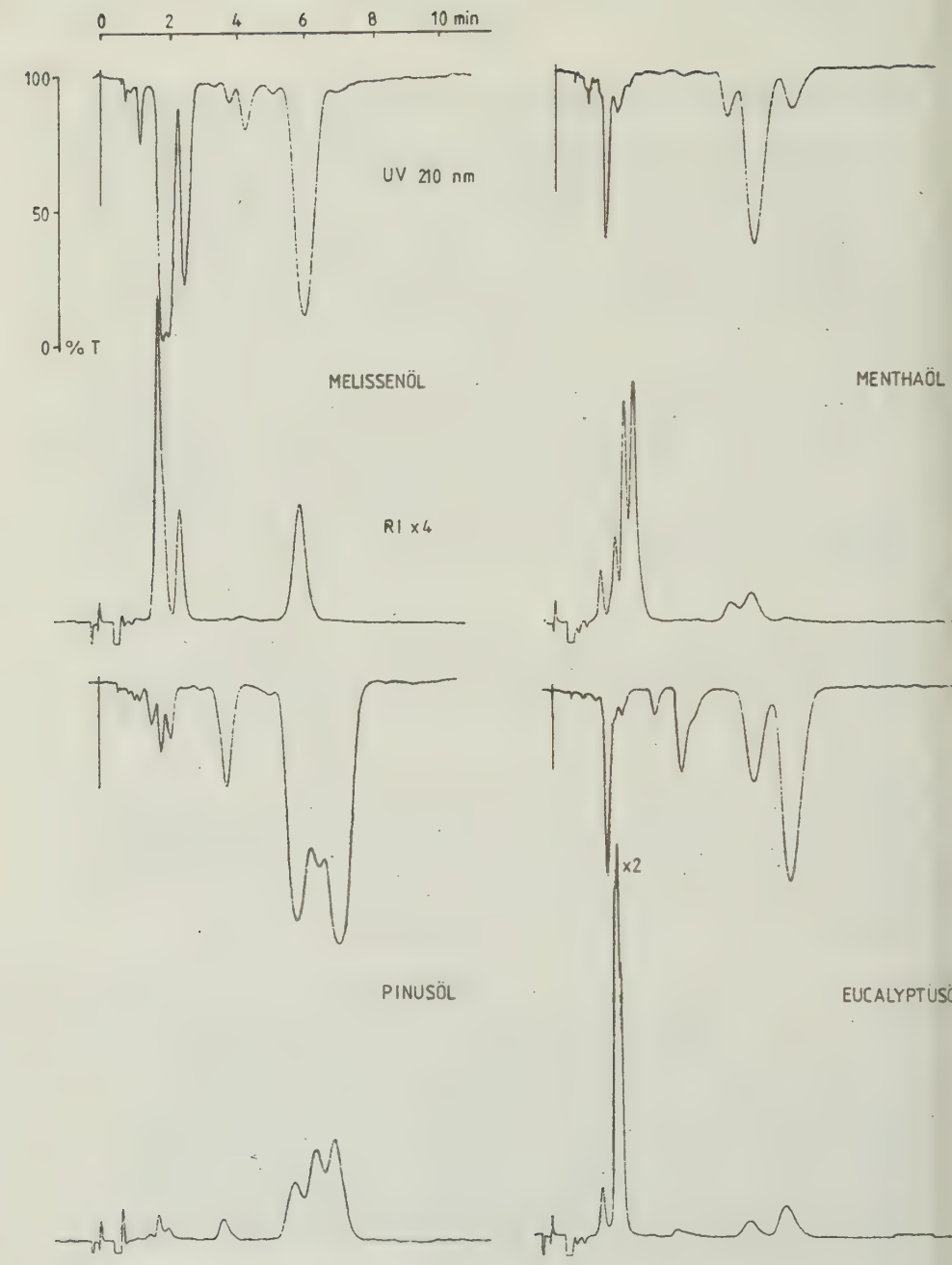


Abb. 4-13a: Trennungen der 4 ätherischen Öle bei UV- (oben) und RI-Detektion (unten); je 5 µl der 5 proz. methanolischen Lösungen; LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm , 0,3 cm i.D.; 60°C Säulentemperatur; Methanol + Wasser, 60 + 40 (V/V), 2 ml/min.

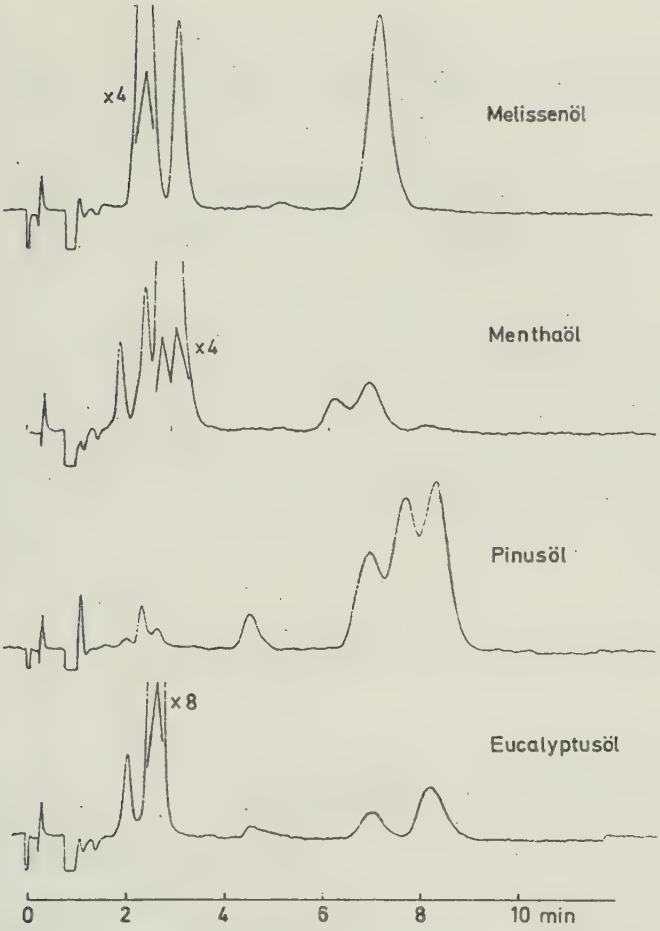


Abb. 4-13b: RI-Kurven aus Abb. 4-13a, - zum besseren Vergleich übereinandergezeichnet.

Abb. 4-13b zeigen die RI-Kurven der Abb. 4-13a zur besseren Übersicht ineinander gezeichnet.

Zur Lösung des gestellten Problems, die ätherischen Öle in Ölgemischen anhand einzelner Komponenten zu bestimmen, erscheint die RI-Detektion in Verbindung mit der RP-Chromatographie wenig geeignet. Auch bei besserer Auflösung der sauerstoffhaltigen Komponenten durch geringere Fm-Stärke, also bei größeren k'-Werten ändert sich an dieser Aussage wenig. Lediglich die Bestimmung von Inhaltsstoffen in den einzelnen Ölen scheint möglich, z.B. von Cineol in Eucalyptusöl. Für die Bestimmung der meisten anderen sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe (wie Citronellal, Geraniol, Menthol, Menthylacetat, Menthon) oder von Stoffgruppen in einem oder mehreren Ölen mittels RI-Detektion dürfte die Chromatographie auf polaren stationären Phasen geeigneter sein als die RP-Chromatographie, da in jenen Systemen u.a. die Selektivität für die sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe besser ist bzw. die Trennung mehr nach funktionellen Gruppen erfolgt.

4.3.2.4 Diskussion der HPLC-RP-Untersuchungen

Abschließend zur LC in reversed-phase Systemen sei einschränkend bemerkt:

- daß die Trennungen bei relativ geringen Trennstufenzahlen ausgeführt wurden: Die benutzten Säulen stellen bezüglich der Bodenhöhe nicht das erreichbare Optimum dar, - soweit die in der Literatur gemachten Angaben vergleichbar sind. Auf Erhöhung der Trennstufenzahl durch längere Säulen oder durch geringere Durchflußraten wurde zugunsten der Analysenzeit verzichtet.
- daß weniger viskose Fm-Gemische, wie Acetonitril/Wasser, wegen der teuren Reinigung von Acetonitril für UV-Zwecke nicht erprobt wurden. Durch geringere Viskosität dürften neben geänderter Fm-Selektivität mehr Trennstufen pro Druck möglich sein.

- daß der Einfluß der Säulentemperatur auf die Selektivität nicht untersucht wurde. Dieser Effekt wurde für gering angesehen.
- daß vermutlich RI-Detektoren auf dem Markt sind, die empfindlicher arbeiten und mit einem kleineren Totvolumen vor der RI-Zelle ausgerüstet sind, so daß besonders bei kleinen Durchflußraten eine geringere Bandenverbreiterung stattfindet.

Diese Einschränkungen ändern jedoch wenig an den gemachten qualitativen Aussagen. Auch bei Säulen mit größeren Trennstufenzahlen dürfte eine vollständige Auflösung aller gut UV-absorbierenden Carbonylverbindungen oder die Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe mittels RI im Gemisch aller vier Öle durch RP-Chromatographie bei vernünftigen Analysenzeiten nicht möglich sein.

4.3.3 Säulenchromatographie auf polarer stationärer Phase

Wie zuvor interessiert vor allem die Bestimmung der sauerstoffhaltigen Terpene, insbesondere der gut UV-absorbierenden, α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen. Nachdem die RP-Chromatographie für diese Verbindungen eine schlechtere Selektivität erbracht hatte als die DC auf Kieselgel, erschien es vorteilhaft, die Trennmöglichkeiten jener Stoffe auf Säulen mit polarer Füllung und lipophilen Fm zu untersuchen.

4.3.3.1 Eigenschaften der stationären Phase

Wie bei den DC-Untersuchungen gezeigt, eignet sich Kieselgel gut für die Chromatographie der sauerstoffhaltigen Terpene. Wie andere anorganische Sorbenzien besitzt es jedoch eine hohe Affinität zu Wasser oder anderen polaren Substanzen und ändert seine chromatographischen Eigenschaften (Retention und

Selektivität) stark mit dem Grad der Belegung durch diese Stoffe. Beispielsweise wurden mit Dichlormethan als Fm bei Steroiden Unterschiede in den k'-Werten um mehr als das 500-fache zwischen aktivem und desaktiviertem Kieselgel gefunden[90,127].

Während die Einstellung des Sorbens auf einen bestimmten Wassergehalt in der DC über die rel. Luftfeuchte und in der konventionellen Säulenchromatographie (SC) über das Zuwiegen von Wasser zum getrockneten Träger schnell und hinreichend genau erfolgen kann, ist in der HPLC die Aktivität der naß gefüllten Säulen über den Wassergehalt der Fm zu kontrollieren. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Wassergehalt des Sorbens und dem Wassergehalt des Fm erfordert je nach Wasserlösungsvermögen und absoluter Wassermenge des Fm unterschiedlich lange Konditionierungszeiten. Bei unpolaren Fm ist der Wassergehalt des Sorbens schwerer konstant zu halten. Ähnliches gilt für andere polare Beimengungen der Fm, wie Alkohole, Säuren oder Basen.

Im allgemeinen wird in der Adsorptionschromatographie (LSC) mit Fm mittlerer Wassersättigung gearbeitet, wobei man annimmt, daß die Kieselgeloberfläche sich zu 50 bis 75 % mit einer monomolekularen Wasserschicht überzieht[z.B.33,S.252]. Bei der Verwendung von trockenem Fm ist zu erwarten, daß an den aktiven Zentren des Trägers Stoffveränderungen stattfinden, und daß durch die fehlende Nivellierung der unterschiedlich energiereichen "Sorptionsstellen" durch das Wasser die Probenmoleküle verschieden stark zurückgehalten werden; daraus resultiert eine geringe lineare Kapazität des Trennsystems und eine zusätzliche Bandenverbreiterung, wobei die Bodenhöhen bis zu dreimal größer sein können als bei mittlerer Wasserbelegung des Sorbens[33,S.251]. Beim Arbeiten mit wassergesättigten Fm würde mehr eine Verteilungs- als eine Adsorptionschromatographie vorliegen. In der DC erwiesen sich aber Imprägnierungen des Kieselgels mit Wasser, die relativen Feuchten von $\geq$ 80 % entsprachen, für die kaum wasserlöslichen ätherischen Öl-Inhaltsstoffe als ungeeignet (vgl. 4.2.4.4).

Der Verwendung von Fm-Gradienten steht in der LSC entgegen, daß mit zunehmender Fm-Stärke auch das Wasserlösungsvermögen der mobilen Phase zunimmt und damit der stationären Phase Wasser entzogen wird. Es ist daher notwendig, nicht nur die Rückkehr zur Ausgangs-Fm-Stärke abzuwarten, sondern auch die stationäre Phase wieder mit dem Wassergehalt des schwächeren Fm ins Gleichgewicht zu bringen. Einen Fm-Gradienten zu erstellen, der für jede Fm-Stärke die dem Belegungsgrad entsprechende Wassermenge enthält, dürfte nur annähernd gelingen. In jedem Fall ist es für die Wiederholbarkeit der Analysen wichtig, den Zeitraum zu ermitteln, der notwendig ist, um die Säule nach Beendigung des Fm-Gradienten wieder in ihr ursprüngliches Gleichgewicht zu bringen. Dies erfordert in der Regel viel Zeit und häufigere Kontrollen und kommt für Routineanalysen kaum in Betracht.

4.3.3.2 Eigenschaften der mobilen Phasen

Von den für die DC-Untersuchungen verwendeten Einkomponenten-Fm, Toluol, Dichloräthan und Dibutyläther, oder deren Homologen würden bei mittlerer rel. Feuchte nur Toluol und 2-Chlorpropan die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen bei den für die HPLC anzustrebenden k'-Werten von 1 bis 10 (oder besser 2 bis 5) eluieren. Mit anderen Lösemitteln dieser Stoffgruppen lassen sich derartige k'-Werte nur durch Zumischen einer die Fm-Stärke herabsetzenden unpolareren Fm-Komponente erreichen.

Die Auswahl der Fm wird in der HPLC u.a. eingeschränkt durch die Detektionsmöglichkeiten und durch die größeren Anforderungen an die Stabilität der Lm. Im Bereich der UV-Maxima der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen sind Fm mit Aromaten nicht und Fm mit Chlorkohlenwasserstoffen teilweise UV-durchlässig. Durch ihre hohen Brechungsindices würden sie außerdem nur eine relativ unempfindliche RI-Detektion erlauben. Schließlich wird bei den Halogenkohlenwasserstoffen befürchtet, daß sie Halogen oder Halogenwasserstoff abspalten. Jene würden vom Sorbens zurückgehalten und könnten dessen chromatographische Eigenschaften verändern.

Somit kommen von den diskutierten Stoffgruppen als Fm für die HPLC der ätherischen Öle nur die Äther in Frage. Diese haben darüber hinaus gegenüber den aromatischen und halogenierten Kohlenwasserstoffen den Vorteil, daß sie die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen besser zu trennen vermögen und den Äther Cineol besser von den Terpenalkoholen, -aldehyden und -ketonen abtrennen, so daß dieser einer schnellen, wenig Trennstufen erfordernden Bestimmung (mittels RI) zugänglich gemacht werden kann.

Von den offenkettigen Äthern (Äthyl-, Isopropyl- und Butyläther) besitzt Butyläther die schwächste eluotrope Kraft. Diese kommt der angestrebten Fm-Stärke am nächsten. Er hat jedoch eine relativ hohe Viskosität (0,7 cP) und war wie Isopropyläther (0,37 cP, 68° C) nicht auf einfache Weise (Destillation, Filtration über aktivierte Sorbenzien) von UV-absorbierenden Verunreinigungen zu befreien. Isopropyläther neigt besonders stark zur Peroxidbildung. Äthyläther (0,23 cP, 35° C) hat eine geringe Viskosität und ist leicht zu reinigen; er besitzt jedoch eine hohe Flüchtigkeit, die u.a. bei dem verwendeten Gerätetyp durch die Bildung von Dampfblasen in den Zuleitungen zu den Pumpen stört (verursacht u.a. durch Wärmeabstrahlung der Motoren zur Pumpenkopfverstellung).

Es wurde daher auf cyclische Äther als polare Fm-Komponenten ausgewichen. Von ihnen wird eine ähnliche chromatographische Selektivität wie von den offenkettigen Äthern erwartet. Tetrahydrofuran (0,51 cP, 65° C) erwies sich als schwer zu reinigen und schlecht haltbar. Dioxan (1,54 cP, 101° C) ist dagegen, einmal gereinigt, relativ stabil. Seine hohe Viskosität stört nicht, da es wegen seiner größeren Fm-Stärke nur in geringen Mengen der unpolaren Fm-Komponente zugemischt zu werden braucht, so daß die Viskosität des Fm praktisch der des unpolaren Lösemittels entspricht.

Als unpolare Fm-Komponenten kommen nur offenkettige, gesättigte Kohlenwasserstoffe in Frage; ungesättigte sind weniger UV-durchlässig, zyklische haben z.T. höhere Viskositäten. Es

wurde die Petroläther-Fraktion 50 - 70° verwendet*), die von aromatischen und teilweise von olefinischen Kohlenwasserstoffen befreit worden war. Sie besitzt einen kleinen Brechungsindex (n_D^{20} = 1,374) und eine geringe Viskosität (0,3 cP), ist relativ einfach zu reinigen und leicht aus Fm mit sauerstoffhaltiger polarer Fm-Komponente zurückzugewinnen.

4.3.3.3 Entwicklung der säulenchromatographischen Trennung der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen

Um für das System Petroläther-Dioxan-Wasser/Kieselgel-Wasser die für die Elution der sauerstoffhaltigen Terpene notwendige Dioxan-Konzentration zu ermitteln, wäre es möglich, die Retentionszeiten für eine Reihe von Fm-Gemischen auf geschlossenen Säulen zu bestimmen. Da jedoch für jeden Fm-Wechsel bei dem verwendeten Gerät mehr als 100 ml UV-reinen Fm zum Durchspülen verbraucht werden, die Einstellung der Fm auf einen bestimmten Wassergehalt durch Mischen von getrocknetem und wassergesättigtem Fm etwas umständlich und nicht ganz sicher ist, und da schließlich die Konditionierungszeiten bei so unpolaren Fm mehrere Hundert Säulentotvolumen erfordern können, erschienen Vorversuche lohnenswert. Gewisse Anhaltspunkte kann hierbei die DC liefern. Voraussetzung für die Übertragung DC-SC[86,129-133] ist, daß man einige Regeln beachtet, und daß die stationäre Phase für beide Systeme dieselbe ist, z.B. Kieselgel mit gleicher spezifischer Oberfläche.

---

*) Nach neueren Untersuchungen kann auch die Dichte der unpolaren Fm-Komponente, also die Kettenlänge der Alkane, einen Einfluß auf die Selektivität haben[128].

a) DC-Vorversuche

Abb. 4-14 zeigt die Trennung der vier identifizierten Carbonyl-Verbindungen neben den vier ätherischen Ölen mit dem Fm Petroläther + Dioxan, 90 + 10, in einer gesättigten N-Kammer (Stahlsche Trogkammer). Das Ergebnis ähnelt dem in Abb. 4-6 mit dem Fm Petroläther + Isopropyläther, 50 + 50. Ein etwas ausgeprägterer Fm-Gradient für das jetzt verwendete, dioxanhaltige Fm ist zu vermuten. Überraschend ist die geringere Auflösung der Substanzpaare Pinocarvon/Pulegon und Citral/Piperiton. Bei den anschließend durchgeführten säulenchromatographischen Vorversuchen zeigte sich, daß mit zunehmendem Dioxangehalt des Fm die Trennung dieser beiden Substanzpaare schlechter wird. Fm mit weniger als 10 % Dioxan in Petroläther ergaben in der DC mit gesättigten N-Kammern keine brauchbaren Ergebnisse.

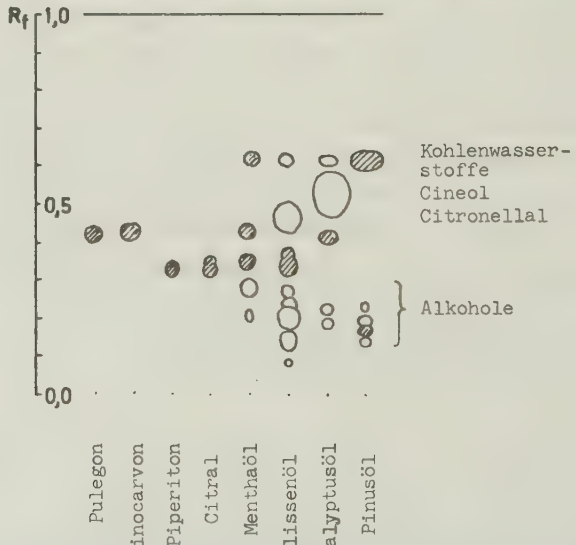


Abb. 4-14: DC der 4 ätherischen Öle (je 200 nl) und der 4 α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen (je 2 nl) auf Kieselgel 60 -Fertigplatten Merck, 50 % rel. Feuchte; Fm: Petroläther 50/70 + Dioxan, 90 + 10, gesättigte N-Kammer;
Detektion: a) Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (schraffierte Zonen),
b) Vanillin-Schwefelsäure (umrandete Zonen).

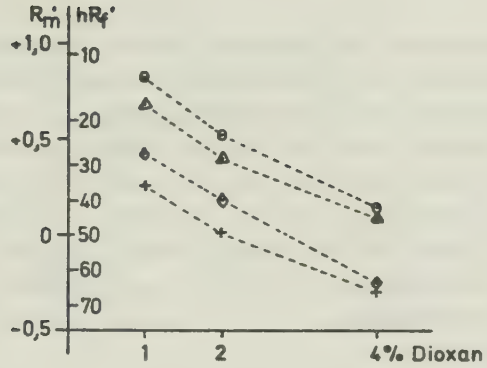


Abb. 4-15: R_m'-Werte der vier α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen; Kieselgel-Fertigplatten Woelm, 55 % rel. Feuchte; Fm: Heptan + Dioxan, 99 + 1, 98 + 2 und 96 + 4 (V/V); DDC in ungesättigter S-Kammer, 20 cm lang; ⊙ = Piperiton, △ = Citral, ◇ = Pulegon, + = Pinocarvon

Ein richtigeres Bild über den gesuchten Dioxangehalt und über die Selektivität des Systems auf der Säule wurde erst mit der Durchlauf-DC (DDC) in ungesättigter S-Kammer erhalten. Hierbei wird die Probe erst aufgegeben, nachdem die Dioxanfront (β-Front) die Abdampflinie erreicht hat. Diese Technik liefert allgemein die beste Übereinstimmung zwischen Flachbett- und Säulenchromatographie.

In Abb. 4-15 sind die mit der DDC erhaltenen R_m'(= log k')-Werte der vier C = O-Verbindungen für die Fm 1 %, 2 % und 4 % Dioxan in Heptan wiedergegeben. Es zeigt sich,

- daß in der DDC eine viel geringere Dioxan-Konzentration des Fm als in der DC mit gesättigter N-Kammer ausreichend ist,
- daß die Selektivität des Systems im Gegensatz zu dem Ergebnis mit der N-Kammer durchaus brauchbar ist, daß also bereits geringe Trennstufenzahlen (500 - 1000) ausreichen, um eine vollständige Auflösung der vier C = O-Verbindungen zu erhalten.

Zur Reproduzierbarkeit der R_f-Werte in der S-Kammer sei gesagt, daß bei Wiederholung der Versuche zwar die relativen Retentionen übereinstimmten, daß jedoch die R_f-Werte von Chromatogramm zu Chromatogramm so streuten, daß sich daraus Abweichungen für die k'-Werte von bis zu 25 % ergeben. Dies läßt sich damit erklären, daß die β-Front (Dioxan-Front) nur sehr langsam wandert (für das Fm mit 1 % Dioxan beträgt ihr R_f-Wert etwa 0,1). Dies bedeutet lange Entwicklungszeiten und erfordert sehr flache und gut abgedichtete S-Kammern.

b) Vorversuche mit trocken gefüllten Säulen geringer Trennleistung

Nachdem die DDC Anhaltspunkte über die in der SC zu erwartende Elutionskraft dioxanhaltiger Fm und über die erforderliche Trennstufenzahl erbracht hatte, interessierte der Einfluß des Wassergehaltes der stationären bzw. der mobilen Phase auf die Selektivität des Systems.

Da kein DC-Kammer-System zur Verfügung stand, das eine Vorbelegung der Schicht mit Wasser (z.B. durch Schwefelsäure-Wasser-Mischungen) u n d eine Probenaufgabe in das S-Kammer-System nach Durchgang der β-Front ermöglicht, und da die DDC bei so geringen Konzentrationen der polaren Fm-Komponente nur wenig genaue Ergebnisse liefert, erschien für die folgenden Versuche die SC geeigneter. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, die mit der Herstellung von völlig getrockneten und wassergesättigten Lösemitteln und den daraus hergestellten Fm verbunden sind, und um die Konditionierungszeiten der Säulen klein zu halten, wurde folgender Weg beschritten: Die Säulen wurden trocken gefüllt und der Wassergehalt des Kieselgels wurde außerhalb der Säule durch Zuwiegen von definierten Wassermengen zum getrockneten Säulenfüllmaterial eingestellt. Es wurde mit Kieselgel 60, Merck, 40 - 63 µm, gearbeitet. Dieses gestattet zwar keine hohen Analysengeschwindigkeiten, ergab jedoch eine gute Repro-

duzierbarkeit der trocken hergestellten Säulenpackungen. Der Wassergehalt des Fm wurde nicht kontrolliert, stattdessen wurden etwa gleich große Vorsäule mit derselben Säulenfüllung und derselben Aktivität zwischen Pumpe und Injektor geschaltet. Nach Durchbruch der Dioxanfront (leicht erkenntlich an den gleichzeitig eluierten UV-absorbierenden Verunreinigungen des Kieselgels) konnte mit der Messung der Retentionszeiten begonnen werden. Je nach Dioxangehalt des Fm und Wassergehalt der stationären Phase waren 10 bis 20 Säulentotvolumen (V_m) zur Gleichgewichtseinstellung in Säule und Vorsäule erforderlich. Die Trennstufenzahlen der Säulen (ca. 250 für die 25 cm langen Säulen bei linearen Geschwindigkeiten von 0,3 bis 0,4 cm/sec) waren für die Ermittlung der k'-Werte und teilweise auch zur Trennung der vier C = O-Verbindungen ausreichend.

In Abb. 4-16 sind für Kieselgel mit unterschiedlicher Wasserbelegung die log k'-Werte*) gegen den Dioxangehalt des Fm aufgetragen. Die Imprägnierungsgrade von 7, 13, 20 und 30 g Wasser auf 100 g Kieselgel 60 Merck entsprechen relativen Luftfeuchten von 25, 50, 64 bzw. 73 % z.B.85).

Es zeigt sich, daß der Wassergehalt des Sorbens bei den gewählten Imprägnierungen nur die k'-Werte verändert (s.a. Abb. 4-3), aber praktisch ohne Einfluß auf die Selektivität des Trennsystems ist. Allenfalls wurde ein geringfügig anderes Verhalten des Aldehyds Citral, besonders bei höheren Wassergehalten, gegenüber den cyclischen Ketonen beobachtet; jenes wird beispielsweise bei 40 % Wasser auf Kieselgel 60 relativ früher eluiert und damit schwerer von Pulegon abtrennbar. Von stärkerem Einfluß auf die Selektivität des Systems erwies sich jedoch der Dioxangehalt des Fm. Mit zunehmender Fm-Stärke verschlechtert sich die Selektivität für die Substanzpaare Pinocarvon/Pulegon und Citral/Piperiton.

---

*) Wie die R_m'-Werte in der DC zeigen die log k'-Werte besser die Unterschiede in der Selektivität:
$\log k'_2 - \log k'_1 = \Delta \log k'_{2/1} = \log \alpha_{2/1}$
$\log \alpha = 0,1 \equiv \alpha = 1,25$
$\log \alpha = 0,2 \equiv \alpha = 1,6$

Für die angestrebte Bestimmung der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen erscheint es daher günstiger bei höheren Wassergehalten und geringeren Dioxankonzentrationen zu arbeiten, z. B. mit Kieselgel 60 Merck + 30 % H_2O und mit Petroläther + Dioxan, 99 + 1, wobei die Carbonylverbindungen bei k'-Werten zwischen 2 bis 5 (log k' 0,3 bis 0,7) getrennt werden. Bei diesen Bedingungen sind die Δlog k'-Werte >0,1 (s. Abb. 4-16), entsprechend einer Selektivität >1,25; d.h., für Grundlinientrennung (R_s = 1,5)*) sind N_{eff} = 900 ausreichend oder N = 1600 für ein Substanzpaar, das um k' = 3 eluiert würde.

Dieser Versuch zeigte u.a. auch, daß die Porosität der Säulen nicht nur, wie erwartet, mit der Wasserbelegung, sondern auch mit dem Dioxangehalt des Fm abnimmt, z.B. etwa um 0,05 bei Änderung des Dioxangehalts von 1 auf 2 %. Dies legt die Vermutung nahe, daß sich die stationäre Phase aus Wasser u n d Dioxan zusammensetzt, und daß evtl. das Verhältnis Dioxan/Wasser in der stationären Phase für deren Selektivität verantwortlich ist.

*) $R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \sqrt{N_{eff_2}} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{1+k'_2} \cdot \sqrt{N_2}$

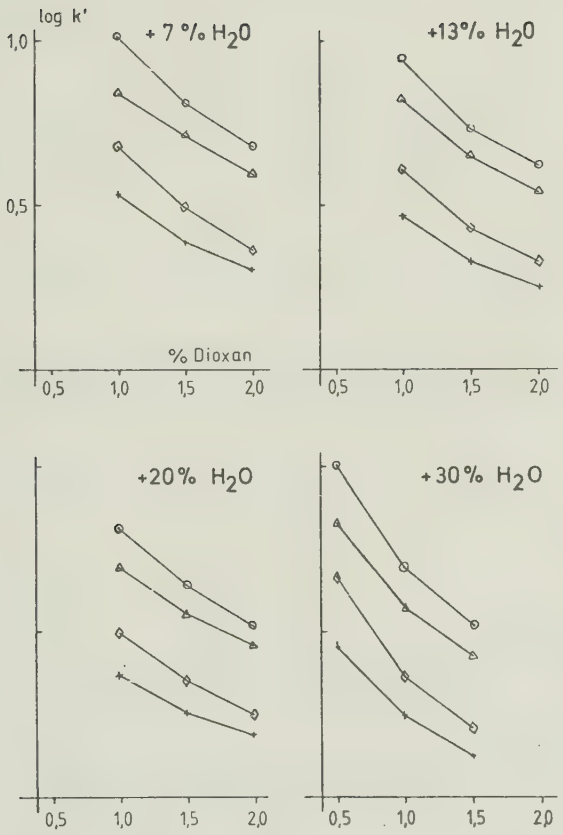


Abb. 4-16: log k'-Werte der 4 α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen, Piperiton, Citral, Pulegon und Pinocarvon, gegen den Dioxangehalt (Vol-% in Petroläther 50/70°) des Fließmittels; Kieselgel 60, Merck, 40-63 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D., mit 7, 13, 20 und 30 % (G/G) Wasser;
Symbole wie in Abb. 4-15.

c) Übertragung der Vorversuche auf HPLC-Trägermaterialien

Bei der Übertragung der Trennungen der Kieselgel 60-Säulen (40 - 63 µm, Merck Art. 9385) auf LiChrosorb SI 60, 5 oder 10 µm, wurden nur halb so große k'-Werte für LiChrosorb gefunden - bei gleichem Dioxan- und Wassergehalt des Fm (Vorsäulen mit Kieselgel 60, 40 - 63 µm, gleicher Aktivität). Vergleichbare Trennungen, also etwa gleiche absolute und relative k'-Werte, wurden bei unverändertem Dioxangehalt des Fm für LiChrosorb SI 60 z.B. bei mittlerem Wassergehalt (= Vorsäule mit Kieselgel 60, 40 - 63 µm, + 13 % (G/G) Wasser) und für Kieselgel 60, 40 - 63 µm, mit einer Wasserbelegung von 30 % (G/G) erhalten (Tab. 4-8 A, B und C). Trotz dieser Abweichung waren die Vorversuche mit den trocken gefüllten Säulen nützlich, da die Abhängigkeit vom Wasser- bzw. Dioxangehalt des Fm für beide Trägermaterialien dieselbe war, d.h., der Einfluß einer Fm-Änderung auf die Trennung konnte aufgrund der Vorversuche vorhergesagt werden.

Schwieriger war die Übertragung der Trennungen auf Vydac-101-Si[134], ein Trägermaterial, bei dem Kieselgel in dünner Schicht (etwa 1 µm) auf Glaskugeln (30 - 44 µm) aufgebracht ist. Die spezifische Oberfläche ist wesentlich geringer als bei durch-und-durch porösem Kieselgel: 12 m^2/g gegenüber 500 m^2/g bei LiChrosorb SI 60. Die Porenstruktur dagegen ist aufgrund der Herstellerangaben ähnlich wie bei LiChrosorb: mittlerer Porendurchmesser 5,7 nm gegenüber 6,0 nm bei LiChrosorb SI 60. Geht man davon aus, daß die k'-Werte der spezifischen Oberfläche des Trägermaterials proportional sind[135], und berücksichtigt man die unterschiedlichen Packungsdichten der Säulenfüllungen, so wären für Vydac-Si etwa 14 mal kleinere k'-Werte zu erwarten als bei LiChrosorb SI 60. Es wurden jedoch für dasselbe Fm nur 5 bis 6 mal kleinere k'-Werte für Vydac-Si gefunden (Tab. 4-8, D, E). Richtige Angaben der Hersteller vorausgesetzt, ließe sich dies damit erklären, daß für die Chromatographie nicht die gesamte Oberfläche zur Verfügung steht, die bei den physikalischen Messungen, z.B. nach BET[136], ermittelt

wird. Bei einem Vergleich von Dünnschichtteilchen mit porösem Material würden sich solche Abweichungen stärker bemerkbar machen als beim Vergleichen von porösen Materialien mit unterschiedlicher Porenstruktur.

Schließlich ist Vydac nach einem firmeneigenen Verfahren desaktiviert. Dies könnte erklären, warum vergleichbare Selektivitäten auf Vydac erst mit sehr viel trockeneren Fm gefunden wurden (Tab. 4-8 B, F, G, und Abb. 4-7).

Tabelle 4-8: k'-Werte von a) Pinocarvon, b) Pulegon, c) Neral, d) Geranial und e) Piperiton auf verschiedenen Trägermaterialien

A) Kieselgel 60, 40 - 63 µm, + 13 % (G/G) Wasser; Vorsäule mit derselben Säulenfüllung; Fm: 1 % Dioxan in Petroläther (V/V)
a) 2,91 b) 4,06 c) und d) 6,62 e) 8,83

B) LiChrosorb Si 60, 10 µm; Vorsäule wie bei (A);
Fm wie bei (A)
a) 1,56 b) 2,21 c) 3,03 d) 3,48 e) 4,45

C) Kieselgel 60, 40 - 63 µm, + 30 % (G/G) Wasser; Vorsäule mit derselben Säulenfüllung; Fm wie bei (A)
a) 1,77 b) 2,45 c) und d) 3,8 e) 5,0

D) LiChrosorb Si 60, 5 µm, + Vorsäule mit Kieselgel 60 + 13 % (G/G) Wasser; Fm: 0,25 % (V/V) Dioxan in Petroläther
a) 2,8 b) 4,45 c) 5,85 d) 6,4 e) 9,4

E) Vydac SI; Vorsäule wie bei (D)
a) 0,47 b) 0,80 c) und d) 1,17 e) 1,77

F) Vydac SI; Vorsäule wie bei (A)
Fm: 0,1 % (V/V) Dioxan in Petroläther
a) 1,09 b) 2,09 c) und d) 2,87 e) 4,86

G) Vydac SI; Vorsäule mit Kieselgel 60, 40 - 63 µm, + 7 % (G/G) Wasser; Fm: 0,2 % (V/V) Dioxan in Petroläther
a) 0,81 b) 1,47 c) und d) 2,16 e) 3,34

4.3.3.4 Dünnschichtteilchen oder durch-und-durch poröse Teilchen

Hohe Analysengeschwindigkeiten, die besonders bei großen Probenzahlen erwünscht sind, lassen sich sowohl mit Dünnschichtteilchen als auch mit sehr feinen (≤ 10 µm) durch-und-durch porösen Teilchen erreichen. Bei beiden Materialien ist der Beitrag der tieferen Poren zur Zonenverbreiterung verringert.

Dünnschichtteilchen, kugelförmig, meist 30 - 50 µm Ø, haben den Vorzug, daß sie sich problemlos (trocken) in Säulen füllen lassen und gut reproduzierbare und stabile Säulenpackungen ergeben. Die Säulen sind weniger anfällig gegen Verstopfen durch nicht gelöste Proben- oder Fm-Bestandteile. Es können größere Probenvolumen (bis 200 µl für 2 mm i.D. Säulen) dosiert werden. Die Säulenwiderstände sind klein, so daß Säulen bis zu 3 m Länge noch sinnvoll sind. Der innere Säulendurchmesser kann bis auf 0,5 mm verringert werden. Nachteilig ist der höhere Preis und besonders die geringere Belastbarkeit dieser Materialien infolge der geringeren spezifischen Oberfläche (allgemein: 1 - 14 m^2/g bei Vydac-Si: 12 m^2/g). 10 effektive Böden pro sec sind möglich[z.B. 37]. Für Piperiton wurden auf Vydac unter den Bedingungen der Abb. 4-17a N = 700 und N_{eff}/sec = 2,4 ermittelt.

Durch-und-durch poröses Trägermaterial gestattet erst bei kleinen Korndurchmessern hohe Analysengeschwindigkeiten. Es ist als gebrochenes Korn vergleichsweise billig. Größere spezifische Oberflächen sind möglich - bei LiChrosorb SI 60: 500 m^2/g. Entsprechend der kleineren Bodenhöhen ist das max. Probevolumen geringer: ca. 20 µl für 250 mm · 3 mm i.D. Säulen. Partikel < 30 µm können praktisch nur naß in Säulen gefüllt werden. Die Säulenpackungen sind schwerer reproduzierbar, weniger dicht als bei trocken gefüllten Säulen und besitzen zuweilen eine kurze Lebensdauer. Naß gefüllte Säulen zeigen erfahrungsgemäß bei Säulendurchmessern < 3 mm geringere Effizienzen. 25 N_{eff}/sec sind erreichbar[z.B.37]. Für Piperiton wurden auf LiChrosorb SI 60, 10 µm, unter den Bedingungen der Abb. 4-17b N = 1500 und N_{eff}/sec = 4 gefunden. Abb. 4-17 zeigt je ein Beispiel der auf Vydac-Si und LiChrosorb SI 60 erhaltenen Trennungen der α,β-unge-

sättigten Carbonylverbindungen.

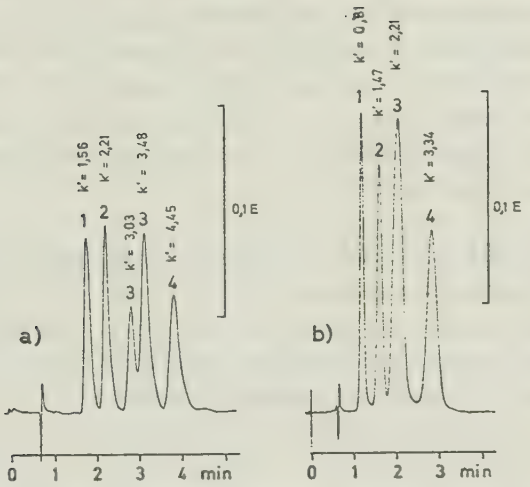


Abb. 4-17: Trennungen der α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen auf durch-und-durch-porösem Kieselgel und auf Kieselgel-Dünnschichtteilchen;
Probenlösung: Pinocarvon (=1), Pulegon (=2), Citral (=3) und Piperiton (=4) zu je 0,04 % in Heptan gelöst (Pinocarvon war bereits teilweise polymerisiert und enthält noch Myrtenal, das fast dasselbe Retentionsvolumen besitzt); Det.: UV 235 nm, 0,4 E;
a) 5 µl Probenlösung, LiChrosorb SI 60, 10 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D.;
Fm: Petroläther 50/70 - Dioxan, 99 + 1 (V/V), wassergesättigt durch Vorsäule mit Kieselgel 60 Merck, 40-63 µm, + 13 % Wasser; 2 ml/min, 23 bar, V_m = 1,40 ml, u_{lin} = 0,6 cm/sec, N = 1500 (für Piperiton)
b) 3 µl Probenlösung, Vydac Si, 100 cm . 0,2 cm i.D.;
Fm: Petroläther 50/70 + Dioxan 99,8 + o,2 (V/V), wassergesättigt durch Vorsäule mit Kieselgel 60 Merck, 40-63 um + 7 % Wasser; 2 ml/min, 64 bar, V_m = 1,30 ml, u_{lin} = 2,55 cm/sec, N = 700 (für Piperiton)

Die weiteren Arbeiten wurden auf durch-und-durch porösem Kieselgel ausgeführt. Entscheidend hierfür war besonders die höhere Belastbarkeit dieses Materials. Eine höhere lineare Kapazität ist erwünscht, da

- die zu bestimmenden UV-aktiven C = O-Verbindungen nur in Konzentrationen < 5 % neben teilweise sehr großen Mengen einer oder zweier Hauptkomponenten vorkommen (eine Überladung der Säule durch die Hauptkomponenten könnte die Trennung der C = O-Verbindungen beeinflussen),

- bei geringen Probemengen das Rauschen der LC-Detektoren die automatische Integration erschweren könnte,
- für Bestimmungen mit dem unempfindlicheren RI-Detektor die Kapazität der Säule nicht groß genug sein kann,
- bei isokratischem Arbeiten sich am Säulenanfang ansammelnde, schwer eluierbare Probenbestandteile die Trennung möglichst spät beeinflussen sollen.

Zugunsten der Dünnschichtteilchen sei jedoch neben den oben genannten Vorteilen noch erwähnt:
- daß die Kapazität - geht man von den k'-Werten aus (s.o.) - nicht so gering war, wie aufgrund der spezifischen Oberflächen pro ml Säulenfüllung berechnet wurde,
- daß es auf Vydac-Si möglich war, Trennungen mit einem Fm-Gradienten von 0,2 nach 2,0 % Dioxan (V/V) in Petroläther schon nach kurzem Rekonditionieren (mit etwa 10 Säulentotvolumen) zu wiederholen. Hierbei wurde mit getrockneten Fm gearbeitet. Dies war möglich, da es sich um ein "teilweise desaktiviertes" Kieselgel handelt. Die Trennstufenhöhen waren allerdings bei trockneren Fm um etwa 20 % größer als bei Fm mit mittlerer Wassersättigung. Mit LiChrosorb dürften bei Gradientenelution und mit trockenen Fm weniger günstige Ergebnisse bezüglich Wiederholbarkeit und Trennstufen-Verlust zu erwarten sein.
- daß es mit 5 oder 10 µm Kieselgel selten gelang, Säulen so zu packen, daß symmetrische Elutionskurven erhalten wurden.

4.3.3.5 Retentionsverhalten der Vergleichsstoffe auf Kieselgel mit dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser

In Tab. 4-9 sind die k'-Werte einiger Vergleichsstoffe auf LiChrosorb SI 60 bei mittlerer Wassersättigung und verschiedenen Dioxangehalten der Fm wiedergegeben. In Abb. 4-18 sind die k'-Werte logarithmisch gegen den log der Dioxankonzentration

aufgetragen*).

Es zeigt sich, daß die k'-Werte der aliphatischen Verbindungen sich mit der Fm-Stärke um den gleichen Faktor ändern: etwa um das 1,6-fache bei Abnahme der Dioxankonzentration um den Faktor 2. Die relative Retention der C = O-Verbindungen stimmt mit den bisherigen Ergebnissen der DC und der Versuchssäulen überein. Abweichend verhalten sich - wie auch in der DC - die aromatischen Verbindungen, insbesondere die Phenole. Es kommt bei diesen Stoffen zu Änderungen der Elutionsfolge bei Änderung des Dioxangehalts des Fm. Selektivitätsänderungen bei aliphatischen Verbindungen infolge geänderter Fm-Stärke, wie sie in der DC für das Substanzpaar Piperiton/Menthol vermutet werden konnten (Abb. 4-2), werden auf der Säule bei diesen Konzentrationen an polarer Fm-Komponente nicht beobachtet.

Verglichen mit der Elutionsfolge, die mit dem Fm Butyläther in der DC gefunden wurde (Abb. 4-1), zeigen einige der Terpene abweichendes Retentionsverhalten. Zum großen Teil dürfte dies auf andere Eigenschaften des jetzt verwendeten, überwiegend aus Petroläther bestehenden Fm zurückzuführen sein, vielleicht auch auf die Schwierigkeiten der DC, eine Hauptkomponente in einem uneinheitlichen Vergleichsstoff mit den relativ spezifischen Sprühreagenzien der DC als solche zu erkennen. In jenen Fällen dürften die mittels RI-Detektion gefundenen LC-Ergebnisse zuverlässiger sein, sofern Fm mit kleinen Brechungsindices verwendet werden, und stark lichtbrechende, aromatische Verunreinigungen durch UV-Detektion ausgeschlossen sind.

---

*) k'-Werte < 1 wurden nur in der Tabelle angegeben, nicht aber für die Abbildung verwendet. Bei nur 10 cm Säulenlänge waren derartig kleine Retentionszeiten nicht genau genug zu messen und beinhalten einen größeren relativen Fehler, der bei logarithmischer Aufzeichnung deutlich hervortritt und mit Selektivitätsänderungen verwechselt werden könnte.

Tabelle 4-9: k'-Werte einiger Vergleichssubstanzen auf LiChrosorb SI 60, 5 µm, 10 cm · 0,3 cm i.D., in Petroläther 50/70° mit 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % (V/V) Dioxan; 2 ml/min; 22° C; der Wassergehalt des Fm wurde durch eine Vorsäule mit Kieselgel 60 Merck, 40 - 63 µm, + 13 % (G/G) Wasser eingestellt

Dioxangehalt des Fm	0,5 %	1,0 %	2,0 %
Menthofuran	0,1	0,1	0,1
Anethol	0,6	0,5	0,4
Menthylacetat	1,2	0,7	0,4
Citronellal	1,4	0,9	0,6
Menthon	1,6	0,9	0,6
Cineol	1,6	0,9	0,6
Linalylacetat	1,6	0,9	0,7
Bornylacetat	1,7	0,9	0,7
Fenchon	1,7	0,9	0,7
Geranylacetat	1,8	1,1	0,9
Pinocarvon	2,7	1,8	1,2
Myrtenal	2,7	1,8	1,2
Campher	4,0	2,4	1,4
Pulegon	4,3	2,4	1,4
Carvon	4,6	2,7	1,7
Neral (Citral a)	5,8	3,3	2,0
Methyleugenol	6,3	4,0	2,6
Geranial (Citral b)	6,5	3,8	2,3
Zimtaldehyd	7,7	5,1	3,6
Anisaldehyd	8,7	6,0	4,3
Eugenol	8,7	6,7	4,9
Piperiton	9,1	5,0	2,8
Neomenthol	10,4	6,4	3,7
Pinocarveol	12,8	8,3	4,9
Linalool	13,3	8,3	4,9
Octen-3-ol-1	15,9	10,0	6,0
Thymol	15,9	11,0	6,9
Carvacrol	18,5	11,9	7,3
Menthol	18,5	11,3	6,4
Borneol		14,2	8,0
Terpineol		15,9	8,5
Farnesol (cis-)		18,7	11,5
Citronellol		21,2	11,8
Farnesol (trans-)		22,8	13,6
Geraniol		23,5	13,6

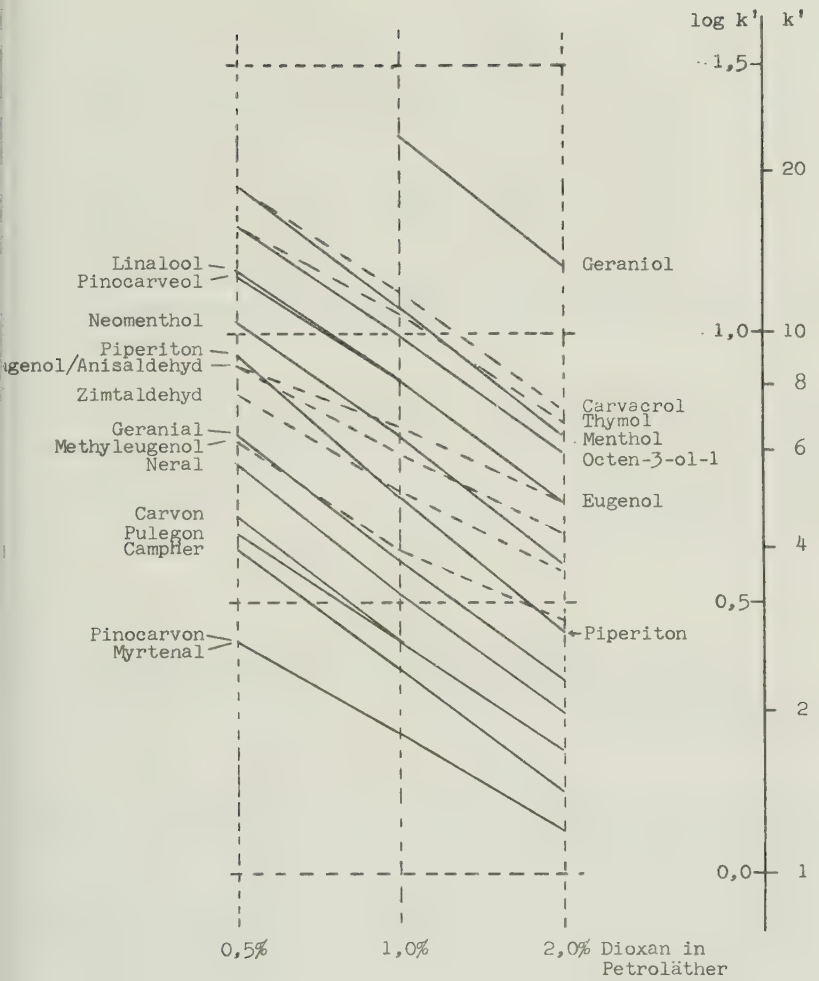


Abb. 4-18: k'-Werte einiger Vergleichssubstanzen aus Tab. 4-9, logarithmisch gegen den Logarithmus der Dioxankonzentration des Fm aufgetragen.
—— aliphatische Verbindungen
---- aromatische Verbindungen

Verglichen mit der Chromatographie auf lipophilen stationären Phasen (Tab. 4-7) ist sowohl der k'-Wert-Bereich der Öl-Inhaltsstoffe als auch die Abhängigkeit der Selektivität von der Fm-Stärke größer. Während in der RP-Chromatographie die sauestoffhaltigen Monoterpene und die Monoterpen-Kohlenwasserstoffe sich in ihren k'-Werten maximal um das 5-fache unterscheiden (Tab. 4-7), findet man auf Kieselgel mit dem dioxanhaltigen Fm, auch wenn man die sehr früh eluierten Kohlenwasserstoffe und Menthofuran unberücksichtigt läßt, noch Unterschiede um das 40-fache. Wollte man z.B. alle Stoffe von Menthylacetat bis Geraniol bei einem k'-Wert von etwa 3 eluieren, so müßte die Dioxankonzentration des Fm von 0,1 % bis 15 % geändert werden, - vorausgesetzt, daß die Abhängigkeit der k'-Werte von der Dioxankonzentration über den gemessenen Bereich hinaus erhalten bleibt.

4.3.3.6 Trennungen der vier ätherischen Öle mit dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser und Möglichkeiten quantitativer Bestimmungen

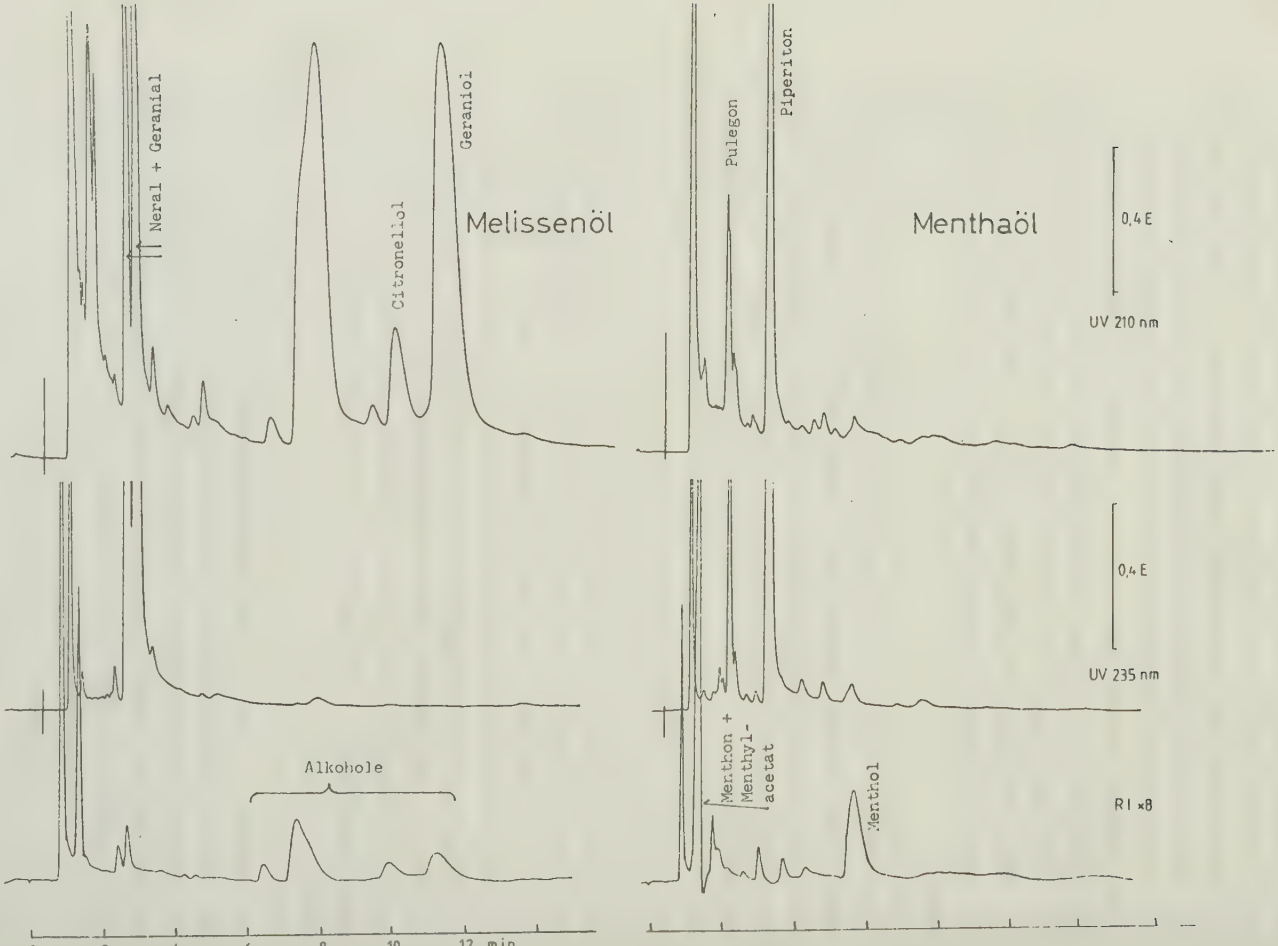
Abb. 4-19 zeigt die Chromatogramme der vier ätherischen Öle auf LiChrosorb SI 60 bei isokratischen Bedingungen mit UV-Detektion bei 210 und 235 nm und mit RI-Detektion. Um die Alkohole bei nicht zu großen k'-Werten ($k' < 15$) zu eluieren, wurde der Dioxangehalt des Fm mit 2 % relativ hoch gewählt. Bei dieser Fm-Stärke werden allerdings Kohlenwasserstoffe, Ester, Äther und die früh erscheinenden Aldehyde und Ketone (Menthon und Citronellal) praktisch nicht getrennt und die interessierenden α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen bei $1,2 < k' < 2,8$ eluiert und dadurch trotz guter Selektivität des Systems nicht vollständig aufgelöst (s.a. Tab. 4-9). Um auch die spät eluierten Terpenalkohole, die teilweise nicht UV-aktiv sind, mit dem unempfindlicheren RI-Detektor gut nachweisen zu können, mußte eine relativ große Probemenge verwendet werden. Dabei wird nahe der Belastbarkeitsgrenze der Säule gearbeitet: 1 mg Öl auf etwa

0,9 g Kieselgel 60 (s.a. 4.3.4.6). Bei diesen Peaks übersteigen die Peaks der gut UV-absorbierenden C = O-Verbindungen, die zu weniger als 5 % in den Ölen vorkommen - auch bei größter Abschwächung des Detektorsignals - die Schreiberbreite (= 2 E) und den linearen Bereich des UV-Detektors. Die Empfindlichkeit des RI-Detektors ist etwas geringer als in der RP-Chromatographie, was einmal auf den etwas höheren RI des jetzt verwendeten Fm (1,3750 gegenüber 1,3415), zum anderen auf die schlechtere Thermostatisierbarkeit des unpolareren Fm gegenüber Methanol-Wasser-Mischungen zurückgeführt werden kann.

Schon bei der nicht allzugroßen Trennstufenzahl von ca. 5000 zeigen die Chromatogramme sehr viele, teilweise unaufgelöste Peaks (z.B. im Pinusöl bei 210 nm), deren Zahl sich durch Herabsetzen der Fm-Stärke vermutlich unschwer verdoppeln ließe. Dies mag für die Selektivität und für die Leistungsfähigkeit der LSC stehen - auch wenn auf eine leicht zu handhabende Gradientenelution verzichtet werden muß.

Der Nutzen mehrerer leicht zu koppelnder Detektoren mit unterschiedlicher Spezifität läßt sich z.B. beim Melissenöl verdeutlichen: Durch Vergleich der UV-Absorption bei 210 nm mit der relativ unspezifischen Anzeige des RI-Detektors sind Rückschlüsse auf Doppelbindungen bei den Terpenalkoholen möglich. Sind für eine Substanz die Anzeigeempfindlichkeiten mit verschiedenen Detektoren bekannt, so können Aussagen über die Einheitlichkeit des betreffenden Peaks im ätherischen Öl gemacht werden.

Die Identität der in den Chromatogrammen bezeichneten Peaks ist durch Vergleich der Retentionszeiten, durch Vergleich der relativen Peakflächen bei UV- und RI-Detektion und aufgrund der bisherigen Kenntnisse der Zusammensetzung der ätherischen Öle gesichert.



(Teil von Abb. 4-19)

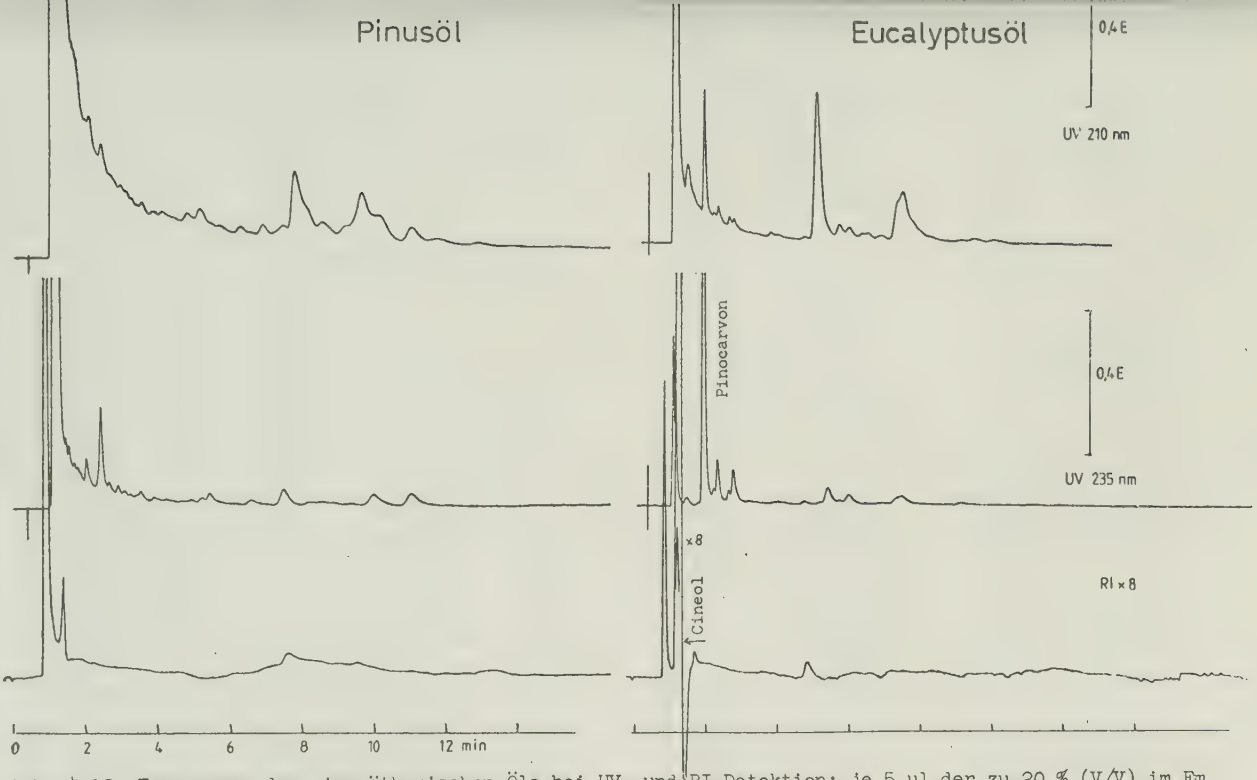


Abb. 4-19: Trennungen der vier ätherischen Öle bei UV- und RI-Detektion; je 5 µl der zu 20 % (V/V) im Fm gelösten Öle; LiChrosorb SI 60, 5 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D., Säulentemp. ca 22°; Fm: Petroläther 50/70° + Dioxan, 98 + 2 (V/V), 2 ml/min; Wassergehalt des Fm im Gleichgewicht mit Kieselgel 60 Merck, 40-63 µm, + 13 % Wasser; Detektion: UV 210 bzw. 235 nm, 2,0 E; RI x 8 (Beim verwendeten Zweikanalschreiber ist das RI-Chromatogramm gegenüber dem UV-Chromatogramm bei 235 nm etwas nach links verschoben.)

Eine Zuordnung nicht identifizierter Peaks zu chemischen Stoffgruppen (nach funktionellen Gruppen) ist aufgrund der k'-Werte in Tab. 4-9 allenfalls bei den Alkoholen möglich, wenn Phenole abwesend sind. Die Bereiche, in denen die anderen Stoffgruppen (Äther, Ester, C = O-Verbindungen) eluiert werden, überschneiden sich in diesem chromatographischen System teilweise.

In Abb. 4-19 scheinen die Terpenalkohole (z.B. RI-Kurve des Melissenöls) besser getrennt als in der DC (z.B. Abb. 4-4). Rechnerisch ergibt sich jedoch z.B. für die beiden weit auseinanderliegenden Alkohole Geraniol und Linalool etwa dieselbe Selektivität auf der Säule mit dem Fm 1 % oder 2 % Dioxan in Petroläther (Tab. 4-9) wie in der DC mit dem Fm Butyläther (Tab. 4-3): etwa $\alpha = 2{,}8$.

Möglichkeiten quantitativer Bestimmungen a) bei UV-Detektion

Die Selektivität des dioxanhaltigen Fm für die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen (Tab. 4-9) ist so gut, daß bei einem Dioxangehalt des Fm von 1 % für die Grundlinientrennung ($R_s = 1{,}5$) der schwerer zu trennenden Substanzpaare Pinocarvon/Pulegon und Geranial/Pipieriton ($\alpha = 1{,}32$) $N_{eff} = 600$ ausreichend sind, bzw. für das schneller wandernde Substanzpaar Pinocarvon/Pulegon N = 1200 bei dieser Fm-Stärke genügen. Die vollständige Trennung der Citral-Isomere, Neral und Geranial, würde bei derselben Fm-Stärke 3400 Trennstufen erfordern, doch erscheint deren Trennung nicht notwendig, da sich die beiden Diastereomere nur geringfügig in ihrer UV-Absorption unterscheiden (Tab. 2-1), so daß für beide Peakflächen der gleiche Responsefaktor verwendet werden kann.

In den vier Ölen vorkommende Inhaltsstoffe mit ähnlichen Retentionszeiten absorbieren bei Wellenlängen größer 225 nm nur sehr wenig UV-Licht, so daß sie keinen größeren Fehler bei einer quantitativen Bestimmung der C = O-Verbindungen verur-

sachen dürften (Abb. 4-19). Die besonders im Melissenöl in größeren Mengen vorkommenden ungesättigten Terpenalkohole stören nur bei kürzeren Wellenlängen, so daß mit der nächsten Probenaufgabe nicht bis zur Elution dieser Verbindungen gewartet werden muß, was zu etwa fünfmal größeren Analysenzeiten führen würde. Die Terpenalkohole könnten allenfalls die Trennung beeinflussen, wenn sie sich bei wiederholter Aufgabe großer Probenmengen in der Säule anreichern.

Es lassen sich also im Gemisch der Öle mittels UV-Detektor bei Wellenlängen um 235 nm bestimmen (u.U. auch bei 254 nm (s. Abb. 4-11), wenn kein Detektor mit variabler Wellenlänge zur Verfügung steht):

- Melissenöl anhand von Citral,
- Menthaöl anhand von Pulegon und Piperiton. Auch die Bestimmung des Menthofurans, das üblicherweise zu 2 bis 7 % in Mentha-piperita-Ölen vorkommt[7], erscheint günstig: Es ist ein typischer Inhaltsstoff des Öls, es besitzt eine brauchbare UV-Absorption (Tab. 2-1) und ist flüssigchromatographisch sehr leicht von anderen Inhaltsstoffen der Öle abzutrennen (s.a. DC: Abb. 4-1).
- Eucalyptusöl anhand von Pinocarvon.
- Im Pinusöl bietet sich im Retentionsbereich der sauerstoffhaltigen Terpene keine Verbindung mit einer nennenswerten UV-Absorption an. Der in Abb. 4-19 bei 235 nm größere Peak, bei dem es sich aufgrund des Retentionsverhaltens und der UV-Absorption ebenfalls um eine α,β-ungesättigte Carbonylverbindung handeln könnte, ist in seiner Größe vergleichbar mit den Peakflächen der störenden kleineren Peaks der anderen Öle.

Schließlich besteht die Möglichkeit, Melissenöl anhand der ungesättigten Terpenalkohole, z.B. bei 215 nm, zu bestimmen, doch sind hierbei größere Fehler zu erwarten:

- durch Inhaltsstoffe aus anderen Ölen, die infolge geringer Peakauflösung die Flächenwerte verfälschen oder die elektronische Integration erschweren,
- durch Messen der UV-Extinktion an Absorptionsflanken oder Absorptionsschultern,

- durch die größere Grundabsorption des Fm und durch Geräteeigenschaften, die zu Nichtlinearität der Detektoranzeige führen (z.B. Streulicht).

Möglichkeiten quantitativer Bestimmungen b) bei RI-Detektion

Sieht man von der schlechten Grundlinie der in Abb. 4-19 gezeigten RI-Chromatogramme ab und läßt auch außer Acht, daß nach Peaks mit kurzer Retentionszeit vom Detektor negative Signale aufgezeichnet werden, so erscheinen im Gemisch der Öle bestimmbar:

- Melissenöl anhand der Alkohole, z.B. dem am stärksten zurückgehaltenen Geraniol,
- Menthaöl anhand der Hauptkomponente Menthol,
- Eucalyptusöl anhand der Hauptkomponente Cineol, welches eventuell bei geringerer Fm-Stärke (als in Tab. 4-9 angegeben) von Menthon und Citronellal und den Estern abtrennbar ist. Es sei jedoch erwähnt, daß - zwar nicht im verwendeten Menthaöl - jedoch allgemein in Mentha-piperita-Ölen Cineol zu 5 - 7 %[7] gefunden wird.
- Im Pinusöl werden bei RI-Detektion (Abb. 4-19) nur wenige Inhaltsstoffe und nur in geringer Menge angezeigt, die auf Kieselgel eine gewisse Retention aufweisen. Diese gehören vermutlich zu den schwerer zu trennenden Substanzgruppen (Alkohole, Ester), so daß eine Bestimmung des Pinusöls auf Kieselgel mittels RI anhand der sauerstoffhaltigen Terpene schwierig und wenig genau wäre.

Für die Bestimmung aller Vertreter einer Stoffgruppe in einem ätherischen Öl, z.B. aller Alkohole, Ester, Kohlenwasserstoffe oder C = O-Verbindungen, die von vielen Arzneibüchern in Ermangelung geeigneter Trennmethoden mit chemischen Methoden erfaßt werden, erscheint die LSC kaum geeignet, da allenfalls Kohlenwasserstoffe und Alkohole für sich eluiert werden, und da auch die unspezifischen LC-Detektoren noch zu spezifisch sind. Beispielsweise dürfte der RI-Detektor ungesättigte Alkohole stärker an-

zeigen als gesättigte. Die mit Hilfe der LC ohne Korrekturfaktoren erhaltenen Werte dürften also nicht genauer sein als beispielsweise eine Bestimmung aller Terpenalkohole mit Hilfe der IR-Spektroskopie.

4.3.3.7 Erfahrungen mit dem Fm Petroläther-Methanol auf Kieselgel

Erst im Anschluß an obige Untersuchungen wurde die Selektivität von Petroläther-Methanol-Mischungen auf Kieselgel 60 untersucht. Im Gegensatz zu dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser baut sich jetzt die stationäre Phase praktisch nur aus Methanol auf. Da dieser sehr viel besser als Wasser von Kohlenwasserstoffen gelöst und weniger stark auf Kieselgel zurückgehalten wird, lassen sich die gewünschten Trennbedingungen auf der Säule schneller einstellen als mit wasserhaltigen Fm ähnlicher Stärke. Auch ein Fm-Gradient erscheint aus demselben Grund schneller wiederholbar als bei einer stationären Phase aus Dioxan und Wasser. Stoffveränderungen werden für dieses System nicht befürchtet, da Methanol genügend polar ist, um Kieselgel zu desaktivieren.

In der DC sind Fm mit so großen Unterschieden zwischen polarer und unpolarer Komponente mit den üblichen Entwicklungskammern (N-Kammern) selten und führen bei geringen Gehalten (< 5 %) an polarer Fm-Komponente zu unbrauchbaren Ergebnissen. In jedem Fall dürfte sich - auch in normal gesättigter N-Kammer - ein steiler Fm-Gradient auf der Schicht ausbilden.

Mit Hilfe der DDC jene Trennbedingungen auf der DC-Schicht herzustellen, die denen auf der Säule ähnlich sind, ist noch langwieriger als mit dem früher verwendeten dioxanhaltigen Fm, da die Methanolfront sehr viel langsamer wandert. Auch erschienen aufgrund der mit dem dioxanhaltigen Fm gemachten Erfahrungen bei den geringen zu erwartenden Methanolgehalten Vorversuche mit der DDC nicht sehr erfolgversprechend.

Lediglich die Vorbedampfung der Schicht mit Methanol oder Methanol-Kohlenwasserstoff-Gemischen und die anschließende Entwicklung des DCs mit der unpolaren Fm-Komponente in ungesättigter S-Kammer stellt einen gangbaren Weg dar, um vergleichbare Trennungen in der DC und auf der Säule zu erhalten. Mit dieser Methode wurden nach Konditionieren der Kieselgel-Schicht mit Methanol (30 min - spätestens nach dieser Zeit nahm das Gewicht der DC-Schicht nicht mehr zu) und Entwickeln der Platte mit n-Heptan in der S-Kammer*) für die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen mittlere R_f-Werte gefunden. Es ergaben sich jedoch aus diesem DC keine Anhaltspunkte über den erforderlichen Methanolgehalt des Fm in der SC, - auch nicht aus der Gewichtszunahme der Schicht während des Konditionierens, da keine Angaben vorliegen, wie die Gleichgewichte Kieselgel/Methanoldampf und Kieselgel/Methanol in Petroläther miteinander in Beziehung zu setzen sind.

Weiter unten werden mit dem Fm Petroläther-Methanol, 99,5 + 0,5 (V/V), k'-Werte gefunden, die in etwa den in der DC ermittelten R_m'-Werten entsprechen (Tab. 4-10). Allerdings ist die Selektivität etwas verschieden: Pulegon wandert in der DC schneller als Myrtenal; auf der Säule ist dies nur bei Methanolgehalten ≥ 1 % der Fall, also bei Bedingungen, die kleinere k'-Werte liefern. Dies wurde damit erklärt, daß bei der Vorbedampfung mit Methanol nicht alles in der DC-Schicht gebundene Wasser durch Methanol verdrängt wird, daß also in der DC die stationäre Phase aus Methanol u n d Wasser besteht**).

---

*) mit Hilfe der Vario-KS-Kammer[89]

**) Auf die gleiche Weise konnten die Abweichungen bezüglich der Selektivität zwischen DC und SC erklärt werden, die bei der Chromatographie der Cannabinoide THC, CBD und CBN, in demselben Fm-System gefunden wurden. CBD wird auf der DC-Schicht relativ stärker zurückgehalten.

Tabelle 4-10: Vergleich der mit DC und SC für Fm-Systeme aus Kohlenwasserstoff und Methanol gefundenen Retentionsdaten.

a) auf Kieselgel 60 Fertigplatten Merck, die lufttrockene Schicht 30 min mit Methanol vorbedampft und mit Heptan in S-Kammer entwickelt, 10 cm Wanderungsstrecke, ξ = 1,14

b) LiChrosorb SI 60, 15 cm · 0,3 cm i.D.; Fm: Petroläther 50/70° - Methanol, 99,5 + 0,5 (V/V), (Werte aus Tabelle 4-11)

	a) $10^{R_m'}$	b) k'
Menthofuran	0,0	0,1
Anethol	0,3	0,3
Myrtenal	1,0	0,8
Pulegon	0,8	0,9
Geranial	1,3	1,3
Piperiton	1,7	1,9

In Tab. 4-11 sind die k'-Werte der Vergleichssubstanzen in Petroläther mit verschiedenem Methanolgehalt auf LiChrosorb SI 60-Säulen wiedergegeben. Wie erwartet, genügen geringere Mengen Methanol im Fm, um gleiche k'-Werte wie bei Fm Petroläther-Dioxan-Wasser (Tab. 4-9) zu erhalten. Ähnliche Fm-Stärken besitzen z.B. Petroläther mit 1 % Dioxan bei mittlerer Wassersättigung und Petroläther mit 0,125 % Methanol. Der k'-Wert-Bereich, in dem die Vergleichsstoffe eluiert werden, ist in beiden Fm-Systemen etwa gleich groß, d.h., daß sich z.B. die k'-Werte der Ester und der Alkohole in beiden Systemen etwa um den gleichen Faktor unterscheiden.

Die Elutionsfolge der Vergleichsstoffe ist bei geringen Fm-Stärken nicht sehr verschieden von der in dioxanhaltigen Fm (Tab. 4-9); mit zunehmendem Methanolgehalt werden jedoch einige aromatische Verbindungen sehr viel stärker zurückgehalten, z.B. werden bei 4 % Methanol einige Phenole und aromatische Aldehyde (Eugenol, Zimtaldehyd und Anisaldehyd) nach oder mit den Terpenalkoholen eluiert, obwohl sie bei 1/8 % Methanol ähnlich schnell wie Piperiton durch die Säule wandern.

Tabelle 4-11: k'-Werte*) einiger Vergleichssubstanzen in Petroläther 50-70° mit unterschiedlichem Methanolgehalt auf LiChrosorb SI 60, 5 µm, 10 cm . 0,3 cm i.D., 2 ml/min

	1/8 %	1/4 %	1/2 %	1 %	2 %	4 %
Menthofuran	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	
Anethol	0,29	0,28	0,28	0,26	0,26	
Menthylacetat	0,70	0,48				
Terpinylacetat	0,74	0,51				
Citronellal	0,81	0,55	0,41	0,30	0,26	
Linalylacetat	0,83	0,54				
Bornylacetat	0,65					
Bornylacetat	0,93	0,58				
Geranylacetat	1,00	0,64				
Menthon	1,09	0,71	0,48			
Fenchon	1,27	0,83	0,59	0,44		
Cineol	1,28	0,75	0,52			
Pinocarvon	1,44	0,94	0,67	0,48	0,41	
Myrtenal	1,60	1,09	0,79	0,59	0,52	0,50
2-Octanon	1,80	1,22	0,86			
2-Hexanon	2,05	1,50	1,07			
Pulegon	2,10	1,35	0,90	0,55	0,48	0,42
Campher	2,12	1,35	0,90	0,59	0,48	
Methyleugenol	2,20	1,49	1,07	0,70	0,59	0,58
Carvon	2,23	1,45	1,03	0,70	0,63	0,58
Farnesal, cis-		1,37	0,83			
trans-		1,59	1,00	0,59		
Neral	2,76	1,72	1,21			
Geranial	2,99	1,90	1,31	0,81	0,70	0,62
Zimtaldehyd	3,28	2,33	1,83	1,48	1,37	1,38
Eugenol	3,44	2,81	2,59	2,22	1,89	1,77
Anisaldehyd	3,85	2,80	2,21	1,78	1,59	1,62
Piperiton	4,57	2,76	1,93	1,15	0,92	0,81
Neomenthol	5,48	3,72	2,76	1,48	1,04	
Fenchol	5,76	4,03	3,17	1,74	1,22	
Linalool	6,97	4,62	3,69	1,93	1,52	
Pinocarveol	7,21	5,03	3,90	2,15		
Octen-3-ol-1			5,48	2,78-		
Thymol	8,33	6,48	6,59	3,89	2,44-	
Menthol		6,77	5,24	2,37	1,44-	
Carvacrol		7,05	7,10	3,93	2,37-	1,65-
α-Terpineol			5,66	2,48	1,56-	
Borneol		4,85	3,90	2,04		
Borneol		11,65	6,10	2,70	1,63-	
Farnesol, cis-		8,73	7,21	2,89	1,63	1,04-
trans-		12,85	9,00	3,33	1,78	1,08-
Citronellol			9,24-	3,74-	2,00-	1,54-
Nerol	19,8	11,93	10,00-	3,70-	2,07-	
Geraniol	21,7	13,93	11,03-	4,30-	2,44-	1,54-
substanzunspezifischer Peak	-	13,0	12,5	7,3	4,1	3,3

*) Mit (-) sind jene Substanzen gekennzeichnet, die bei RI-Detektion negative Signale ergaben.
Obwohl die 2. Stelle nach dem Komma bei einer so kurzen Säule nicht genau zu messen ist, wurden die Werte nicht gerundet, um kleine Unterschiede zwischen benachbarten Substanzen nicht zu verwischen oder zu vergrößern. Die Retentionszeiten waren etwa in der obigen Reihenfolge gemessen worde, so daß Veränderungen der chromatographischen Bedingungen nur die relative Retention weit auseinander liegender Stoffe beeinflussen.

Überraschender noch erscheint, daß auch bei geringen Methanolgehalten eine Trennung nach der Länge der aliphatischen Kohlenstoffkette möglich ist. So werden, im Gegensatz zum dioxanhaltigen Fm, Farnesol und Geraniol bzw. deren Aldehyde getrennt eluiert; mit zunehmendem Methanolgehalt des Fm wird das entsprechende Monoterpen stärker als das Sesquiterpenderivat zurückgehalten. Dies legt die Vermutung nahe, daß bei größeren Methanolgehalten des Fm Verteilungsprozesse überwiegen. Dafür sprechen auch die gefundenen Porositäten der Säule, die beginnend bei 0,1 % Methanol im Fm ständig abnehmen: von 0,83 nach 0,69 bei 4,0 % Methanol im Fm*). Mit zunehmendem Methanolgehalt nimmt also das der mobilen Phase zur Verfügung stehende Volumen ab; die stationäre Phase besteht dann nicht mehr nur aus einem Film über der Kieselgeloberfläche, sondern auch aus stehender polarer Flüssigkeit in den Poren des Trägermaterials.

Bei den Monoterpen-Alkoholen und den Monoterpen-Essigsäureestern wurde keine Änderung der Elutionsfolge mit der Fm-Stärke beobachtet.

Für die beabsichtigte Bestimmung der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen ist die Selektivität des Systems teilweise besser aber weniger beeinflußbar als bei dem System Petroläther-Dioxan-Wasser. Mit steigendem Methanolgehalt des Fm nimmt - in dem untersuchten Bereich die Selektivität für das Substanzpaar Piperiton/Geranial ab und für das Substanzpaar Myrtenal/Pinocarvon zu. Pulegon und Myrtenal werden bei niedrigen und bei hohen Methanolgehalten am besten getrennt, - es findet eine Umkehr der Elutionsfolge statt. Die Selektivität der beiden Citral-Isomere, Neral und Geranial, wird nicht von der Fm-Stärke beeinflußt.

Abb. 4-20 zeigt die Trennung der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen im Fm Petroläther + 0,15 % Methanol. Die Probenlösung ist dieselbe wie in Abb. 4-17. Es zeigt sich jetzt deutlicher, daß das synthetisierte Pinocarvon noch Myrtenal enthält. Mit dem zuvor verwendeten Fm war dies kaum nachzuweisen und in der

---

*) Die Porosität kann minimal 0,4 betragen[137].

DC nur über die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zonen. Lediglich durch die GC waren diese beiden Stoffe ohne Schwierigkeiten zu trennen.

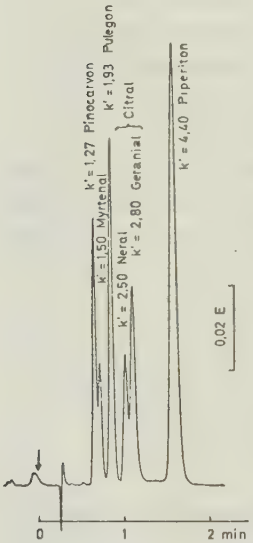


Abb. 4-20

Trennung der α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen;
je 0,4 nl Pinocarvon, Pulegon, Citral und Piperiton (zu 0,04 % in Heptan);
LiChrosorb SI 60, 5 µm, 10 cm . 0,3 cm i.D.;
Petroläther 50/70° mit 0,15 % Methanol,
2 ml/min, 41 bar;
UV 235 nm, 0,2 E;
V_m = 0,60 ml, u_{lin} = 0,55 cm/sec, N = 2200,
N_{eff}/sec = 15 (für Piperiton)
= 18 (für Pulegon)

Als weniger vorteilhaft erwiesen sich Fm aus Petroläther und Methanol bei RI-Detektion. Bei den Bestimmungen der Retentionszeiten für Tab. 4-11 wurde folgendes festgestellt:

- Da die RI der verwendeten Fm-Gemische relativ klein sind (je nach Methanolgehalt des Fm n_D^{22} = 1,374 - 1,372), waren für praktisch alle Probensubstanzen positive Signale erwartet worden. Gefunden wurden jedoch sehr häufig negative Peaks, ohne daß eine Beziehung zum RI der reinen Vergleichssubstanz (s. Tab. 2-1) hergestellt werden konnte; auch einige der stark lichtbrechenden, aromatischen Verbindungen gaben negative Signale. Mit abnehmendem Methanolgehalt des Fm wurden weniger Substanzen negativ angezeigt, und die Peakflächen der positiv angezeigten Stoffe wurden relativ größer, obwohl mit abnehmendem Methanolgehalt der RI des Fm zunimmt.

Negative Detektor-Signale wurden besonders bei den Stoffen beobachtet, die stark auf der Säule zurückgehalten werden: bei den Alkoholen und Phenolen (Tab. 4-11).

- Es wurden - auch für das reine Proben-Lösemittel Heptan - stets positive RI-Peaks beobachtet, die konstante Retentionszeiten aufwiesen, eine der Trennstufenzahl der Säule und der Retentionszeit entsprechende Peakbreite hatten und mit abnehmender Fm-Stärke später, in der Regel nach den Alkoholen, eluiert wurden. Die Größe dieser nichtsubstanzspezifischen Peaks war bei Heptan am kleinsten, für das gleiche Volumen Toluol etwa viermal so groß und für die etwa 0,5 %igen Probenlösungen der Vergleichsstoffe (in Heptan) bis zu zehnmal größer. Lösungen der Terpenalkohole ergaben in der Regel größere substanzunspezifische Peaks. Mit abnehmendem Methanolgehalt des Fm wurden diese Peaks kleiner.

Für beide Erscheinungen wurde folgende Erklärung gefunden: Infolge der guten Löslichkeit der stationären Phase sind Heptan und noch mehr die Probenlösungen in der Lage, dem Kieselgel Methanol zu entziehen. Die Probensubstanzen werden in Fm-Zonen mit größerem Methanolgehalt chromatographiert und auch detektiert. Daher können diese Zonen weniger lichtbrechend sein als das Fm, was zu negativen Peaks führt, daher die unerwartete Abhängigkeit der Detektoranzeige nicht nur von der Refraktion der reinen Verbindung, sondern auch von deren funktionellen Gruppen bzw. ihrer Affinität zur stationären Phase.

Die positiven, nicht substanzspezifischen Peaks, die bei allen Probenlösungen auftraten, entstünden dann dadurch, daß der an Methanol verarmte Träger dem nachfolgenden Fm Methanol entzieht. Dieses weniger Methanol enthaltende Eluat hat einen größeren RI und wird daher vom Detektor positiv angezeigt, und zwar um so mehr, je größer der Methanolgehalt des Fm ist.

Obige Erscheinungen waren bei dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser nicht beobachtet worden. Obwohl der RI dieses Fm größer ist, ergaben alle Vergleichsstoffe positive Peaks. Die oben be-

schriebenen substanzunspezifischen Peaks fehlten. Nur nach Peaks mit kurzer Retentionszeit wurden im dioxanhaltigen Fm negative Peaks beobachtet, die mit der Probenmenge und dem Dioxangehalt des Fm zunahmen (z.B. Abb. 4-19 nach dem Cineol-Peak; s.a. 4.3.5.2). Einschänkend sei bemerkt, daß mit dem dioxanhaltigen Fm nur bei geringen Fm-Stärken gearbeitet wurde, - mit Dioxangehalten < 2 %, entsprechend Fm mit weniger als 0,25 % Methanol.

Mit einer gewissen Berechtigung können also Fm vom Typ Petroläther-Methanol als "nichtideal" bezeichnet werden. Für quantitative Bestimmungen erscheinen sie in Verbindung mit dem RI-Detektor wenig geeignet. Selbst wenn die beschriebenen Anomalien gut wiederholbar sein sollten und für einen engen Bereich eine lineare Beziehung zwischen Detektoranzeige und Probenkonzentration bestehen sollte, so vergrößern in jedem Fall die spät eluierten, substanzunspezifischen Peaks die Analysenzeit. Bei UV-Detektion könnten diese substanzunspezifischen Peaks stören, wenn sie mit dem UV-absorbierenden Peak einer Probensubstanz derselben oder der nächsten Analyse zusammenfallen; es könnte dann zu "verschrobenen" Peakformen kommen.

Auch waren die Retentionszeiten in Fm mit geringem Methanolgehalt (0,125 bzw. 0,25 %) schwerer konstant zu halten. Es wird nicht ausgeschlossen, daß Systeme mit so guter Löslichkeit der stationären Phase und so geringen Mengen an polarer Fm-Komponente gegen Temperaturschwankungen anfälliger sind als Systeme, bei denen durch geringe Wasserbeimengung die stationäre Phase hydrophiler und damit stärker an das Kieselgel gebunden ist[138].

Es wird weiter angenommen, daß durch Zusatz von Wasser zum Fm die unerwartete RI-Detektor-Ansprechbarkeit und die nichtsubstanzspezifischen Peaks kleiner werden oder ganz verschwinden. Die hierbei entstehende stationäre Phase aus Wasser-Methanol dürfte neben der geringeren Löslichkeit in der mobilen Phase auch andere chromatographische Eigenschaften aufweisen, z.B. eine noch größere relative Retention der Phenole oder eine

andere Elutionsfolge der C = O-Verbindungen, ähnlich jener im DC-Vorversuch (Tab. 4-10). Mit einem derartigen Fm die Trennbedingungen auf der Säule einzustellen, dürfte jedoch länger dauern als bei dem Fm Petroläther-Dioxan-Wasser.

Ein Nachteil des methanolhaltigen Fm ist schließlich die geringere Beladbarkeit des Systems, was sich besonders bei Bestimmungen mit dem RI-Detektor auswirkt (s. 4.3.4.6).

Endlich war es nicht möglich, wie oben angenommen, mit dem Fm Petroläther-Methanol einen linearen Fm-Gradienten, z.B. von 0,1 % nach 0,9 % Methanol, auf der Säule zu erstellen. Denn bei der Anfangs-Fm-Stärke ist Kieselgel noch nicht maximal mit Methanol belegt; es entzieht daher bei ansteigender Fm-Stärke dem Fm relativ viel Methanol. Bei dem Versuch, Melissenöl mit Gradientenelution zu trennen, wurden alle Inhaltsstoffe mit k'-Werten kleiner als die Terpenalkohole bei praktisch isokratischen Bedingungen getrennt, die Terpenalkohole wurden mit der Methanol-Front ungetrennt eluiert. Das Problem lag also nicht in der baldigen Rückkehr zur Ausgangs-Fm-Stürke, sondern in der Unmöglichkeit, einen in etwa linearen Ansteig der Fm-Stärke in nicht allzulanger Zeit zu erreichen.

Ergänzend sei bemerkt, daß sich in Anlehnung an das Fm Petroläther-Methanol relativ einfach eine Vielzahl von weiteren Fm mit ähnlicher Fm-Stärke finden lassen, indem man Methanol durch etwa äquimolare Mengen anderer polarer Lösemittel ersetzt, z.B. Formamid, Äthylenglykol, Äthanolamin, DMSO, Acetonitril, DMF, Glykolmonomethyläther oder Äthanol. Dabei dürften sich teilweise andersartige Fm-Selektivitäten ergeben.

4.3.3.8 Chromatographisches Verhalten der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen auf aktiviertem Kieselgel

An sich war es im folgenden Versuch die Absicht, mit dioxanhaltigem Petroläther auf wasserfreiem Kieselgel - wenigstens für das empfindlichere Citral - Stoffveränderungen auf der Säule nachzuweisen. Es wurden jedoch auf aktiviertem und auf desaktiviertem LiChrosorb SI 60 für dieselbe Probelösung identische Peakflächenverhältnisse zwischen Citral und dem als Standard zugemischten, stabileren Pulegon gefunden.

Abb. 4-21 zeigt die Trennung von Citral und Pulegon auf Kieselgel Aktivität I (a) und II - III (b) bei ähnlichen k'-Werten und entsprechend geänderter Fm-Stärke. (Probevolumen, Durchflußrate, Detektorabschwächung und Papiergeschwindigkeit sind gleich.)

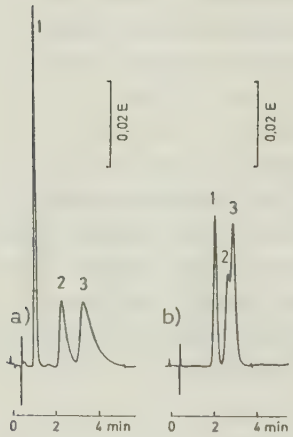


Abb. 4-21: Trennung von Pulegon und Citral auf LiChrosorb SI 60, 10 µm, 15 cm . 0,3 cm i.D.; je 0,8 nl Pulegon und Citral (zu 0,04 % in Heptan gelöst); UV 235 nm, 0,2 E; 2 ml/min, 0,55 cm/sec, 22 bar;
a) Petroläther 50/70 + Dioxan, 98 + 2 (V/V), wasserfrei durch Vorsäule mit getrocknetem Kieselgel 60 Merck, 40-63 µm (= Akt.I; s.a. exp. Teil 7.5.)
b) Petroläther 50/70 + Dioxan, 99,5 + 0,5 (V/V), mit mittlerer Wassersättigung durch Vorsäule mit Kieselgel 60 Merck, 40-63 µm, + 13 % Wasser (= Akt. II-III)
1 = Pulegon, 2 = Neral, 3 = Geranial

Ebenfalls unerwartet war, daß die Retentionszeiten und die Trennstufenhöhen der zyklischen Ketone relativ wenig durch die hohe Aktivität des Kieselgels beeinflußt werden. Dagegen zeigen die untersuchten Aldehyde, Myrtenal, Neral und Geranial, eine größere Änderung der relativen Retention und sehr viel geringere Trennstufenhöhen infolge Peaktailings (Tab. 4-12).

Tabelle 4-12: Gegenüberstellung des chromatographischen Verhaltens der Carbonylverbindungen auf LiChrosorb SI 60 (s.a. Abb. 4-21) nach dem Trocknen der Säule (= Akt. I) und nach dem Konditionieren durch Fm mit mittlerer Wassersättigung (= Akt. II - III; im Gleichgewicht mit Kieselgel 60 Merck, 40 - 63 µm + 13 % Wasser)

Aktivität		I	II - III
% Dioxan in Petroläther (V/V)		2,0	0,5
Porosität der Säule		0,85	0,83
k'-Werte:	Pinocarvon	1,1	2,7
	Pulegon	1,5	4,3
	Myrtenal	2,5	2,7
	Piperiton	3,4	9,1
	Neral	5,6	5,8
	Geranial	10,5	6,5
Trennstufenhöhen, H (mm)			
	Pulegon	0,18	0,15
	Neral (1 : 2000000 g/g)	0,43	etwa wie bei
	Geranial (1 : 1000000 g/g)	0,75	Pulegon

Die Unsymmetrie dieser Peaks ebenso wie das stärkere Kurzzeitrauschen auf der abfallenden Peakflanke können durch eine nichtlineare Sorptionsisotherme (Langmuir-Isotherme) erklärt werden. Dafür spricht auch die äußerst geringe Beladbarkeit des Systems; noch bei einem Verhältnis Probemenge : Sorbens von 1 : 1000000 ist die Säule überladen. Für Tab. 4-12 wurden daher die k'-Werte der Aldehyde auf getrocknetem Kieselgel mit Hilfe eines Punktes nahe dem hinteren Peakende errechnet; bei der Trennstufenzahl ist das Verhältnis Probemenge : Sorbens mitangegeben.

Aufgrund der nichtlinearen Sorptionsisothermen wird angenommen, daß Dioxan nicht in der Lage ist, Kieselgel ausreichend zu desaktivieren. Dennoch erscheinen nach diesem Versuch Trennungen auf aktiviertem Kieselgel möglich und auch vorteilhaft, wenn die gewünschte Selektivität anders nicht zu erhalten ist. Voraussetzung ist eine lineare Sorptionsisotherme für die zu trennenden Verbindungen. Andernfalls wäre das Trennergebnis sehr von der Probemenge abhängig und es dürften nur kleine Substanz-

mengen auf die Säule aufgegeben werden. Die automatische Integration wäre erschwert durch das starke Peaktailing und das bei größerer Detektorempfindlichkeit höhere Grundlinienrauschen.

Nichtlinearität der Sorptionsisothermen ist in dioxanhaltigen wasserfreien Fm außer bei den Aldehyden auch bei Stoffen zu erwarten, die polarere funktionelle Gruppen besitzen, z.B. bei den Terpenalkoholen.

4.3.3.9 Diskussion der HPLC-Untersuchungen auf Kieselgel

Es wurde gezeigt, daß es möglich ist - auch bei sehr geringen Konzentrationen an polarer Fm-Komponente - DC-Systeme auf Säulen zu übertragen. Zwar sind bei Fm mit weniger als 10 % polarer Fm-Komponente DC-Vorversuche langwieriger und die Retentionswerte der Säule nur ungenau vorauszusagen, doch stimmten die relativen Retentionen in beiden Systemen überein, so daß die DC für die Beurteilung der zu erwartenden Selektivität eines HPLC-Systems von Nutzen ist.

Bereits die geringe Zahl der verwendeten Fm zeigte, daß Kieselgel oder polare stationäre Phasen auf Kieselgel ein besseres Trennvermögen für die lipophilen Inhaltsstoffe ätherischer Öle und für die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen aufweisen als RP-Systeme. Die k'-Werte der Terpene mit verschiedenen funktionellen Gruppen unterscheiden sich in normalen LSC-Systemen sehr viel mehr, und auch innerhalb einer Stoffgruppe läßt sich die relative Retention durch Fm-Änderungen stärker beeinflussen. Bei den Arbeiten auf Kieselgel mit wasserhaltigen Zweikomponenten-Fm ergaben sich Anhaltspunkte, daß die stationären Phasen neben Wasser auch die jeweiligen polaren Fm-Komponenten enthalten. Der Wassergehalt des Fm beeinflußt damit nicht nur die k'-Werte durch die Zahl der desaktivierten Silanolgruppen, sondern auch die Selektivität des Systems durch das Verhältnis

Wasser/polare Fm-Komponente in der stationären Phase und vermutlich auch die Beladbarkeit des Systems durch die Menge an polarer Fm-Komponente, die in dem an das Kieselgel gebundenen Wasser gelöst werden kann.

Außerdem zeigte sich bei der Chromatographie mit Zweikomponenten-Fm, daß die meisten Probensubstanzen in einer solvatisierten Form durch die Säule wandern oder wenigstens in Zonen mit einem anderen Mischungsverhältnis der Fm-Komponenten.

Auch wenn die Trennbedingungen auf Kieselgelsäulen schwerer zu entwickeln und einzustellen sind als auf RP-Säulen, und die k'-Werte bei so geringen Fm-Stärken weniger gut reproduzierbar sein mögen, und obwohl Gradientenelution praktisch ausgeschlossen ist, so ist doch der LC auf Kieselgel bei den ätherischen Ölen der Vorzug zu geben. Neben der allgemein günstigeren Selektivität sind mit unpolaren Fm infolge der meist geringeren Fm-Viskositäten mehr Trennstufenzahlen pro Zeit und pro Druck möglich. Die RP-Chromatographie mag bei geringen Probenzahlen zur Untersuchung einzelner Öle oder bei Trennungen Anwendung finden, bei denen sich die Substanzen nur in der Zahl der Methyl- bzw. Methylengruppen unterscheiden. Für die Bestimmung der vorliegenden Öle im Gemisch aller Öle bietet die RP-Chromatographie allenfalls Vorteile bei der Analyse des Pinusöls - anhand eines Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffs (Abb. 4-12) -, weil in diesem Öl die auf Kieselgel gut zu trennenden sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe nur in so geringen Mengen vorkommen, daß Bestimmungen dieser Komponenten mittels UV oder RI-Detektion zu relativ größeren Fehlern führen würden.

Stoffveränderungen waren in der LC auch auf Kieselgel höchster Aktivität mit dem dioxanhaltigen Fm nicht nachzuweisen. Es wurde lediglich eine nichtlineare Sorptionsisotherme bei den Terpenaldehyden gefunden, nicht jedoch bei den Ketonen.

Schließlich sind die auf Kieselgel z.B. mit dem dioxanhaltigen Fm gefundenen k'-Werte in etwa übertragbar auf andere monofunktionelle Derivate mit gleicher Stereochemie der funktionel-

len Gruppe, da bei diesem Fm die Länge des aliphatischen Kohlenstoffrestes von geringem Einfluß auf die Retention ist: Vergleichbar z.B. ist das Retentionsverhalten von Geranial (trans) und trans-Farnesal, bzw. der entsprechenden cis-Derivate oder der entsprechenden Alkohole; abweichend dagegen sind die k'-Werte von Geraniol und Linalool (prim. und sek. Alkohol) oder Menthol und Neomenthol (äquatorial- und axial-stehende OH-Gruppe). Überhaupt lassen LSC-Retentionswerte eher auf eine funktionelle Gruppe schließen als GC- oder LC-RP-Retentionswerte, da in der LC auf polaren Trägern die Retention stärker von der Polarität der funktionellen Gruppe beherrscht wird. Den Vertretern der einzelnen chemischen Stoffgruppen konnten jedoch nicht getrennte Retentionsbereiche zugewiesen werden, vielmehr überschnitten sich die k'-Bereiche teilweise. Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, daß mit Fm aus Petroläther-Dichlormethan und/oder bei einem geringeren Wassergehalt des Fm, entsprechend z.B. einer Belegung des Kieselgel 60 mit 7 % statt mit 13 % Wasser, die Trennung in stärkerem Maße nach funktionellen Gruppen erfolgt.

4.3.4 Faktoren, die die quantitative LC-Analyse beeinflussen[30,31,33,36-38,139-143)]

Wie bei anderen chromatographischen Methoden ist eine ausreichende Trennung der zu bestimmenden Komponenten Voraussetzung für eine zuverlässige quantitative Bestimmung. Die Auflösung R_s zweier Komponenten ist eine Funktion der chromatographischen Selektivität α und der effektiven Trennstufenzahl N_{eff}. Die aus den Chromatogrammen ermittelten Trennstufenzahlen sind nicht nur abhängig von der Struktur und Korngröße des Trägermaterials, der Homogenität der Packung, der Säulenlänge, der Fm-Viskosität, der Säulentemperatur, der Menge und der Viskosität der stationären Phase und der linearen Fließgeschwindigkeit, sie werden auch beeinflußt:

- von der Verteilung der Probe auf dem Säulenkopf, welche abhängig ist von der Größe der Totvolumina vor der Säule, der Konstruktion des Säulenkopfes, der verwendeten Dosiermethode, dem Probenvolumen, der Probenkonzentration und u.U. von der Fm-Stärke und der Dichte der Probenlösung,
- von der Probenmenge, also der Beladbarkeit des chromatographischen Systems, die nicht nur für jedes Trennsystem, sondern auch für verschiedene Substanzen in einem System unterschiedlich sein kann,
- vom Innendurchmesser der Säule, d.h., wie schnell bei Punktdosierung eine Substanzzone die weniger homogen gepackten äußeren Bereiche des Säulenbettes erreicht,
- von den Totvolumina nach der Säule
- vom Volumen und der Konstruktion der Detektorzelle
- von der Zeitkonstanten des Detektors und der Registriereinrichtung.

Außer durch die Auflösung wird die Genauigkeit und Richtigkeit einer chromatographischen Analyse u.a. beeinflußt durch:
- die Genauigkeit der Probendosierung
- die Konstanz der Durchflußrate, der Temperatur und der Fm-Stärke
- Stoffveränderungen auf der Säule
- die Linearität der Detektoren und der Registriereinrichtung
- das zum Auswerten der Chromatogramme gewählte Verfahren: Peakhöhe oder Peakfläche
- die Umwandlung der Meßwerte in das Analysenergebnis.

4.3.4.1 Probenvorbereitung (Proben-Lm, -Konzentration und -Volumen) (s.a. GC 3.3.1)

Allgemein und besonders beim Arbeiten mit unspezifischen Detektoren ist es am günstigsten, die Proben in der mobilen Phase zu verteilen, sofern sie darin ausreichend löslich und genügend stabil sind. Proben-Lm mit geringerer Fm-Stärke

ergeben höhere Trennstufenzahlen, da eine Konzentrierung der Probensubstanzen am Säulenkopf stattfindet, was sich besonders bei großen Probenvolumina auswirkt. Proben-Lm mit größerer Fm-Stärke können kleinere Trennstufenzahlen[37,144] ergeben oder gar die Trennung beeinflussen. Lm oder Lm-Gemische mit ähnlicher Fm-Stärke aber anderer Zusammensetzung können sinnvoll sein, wenn die Probensubstanzen in der mobilen Phase nicht in der erforderlichen Konzentration löslich sind. Daneben kann auch die Dichte des Proben-Lm von Einfluß sein, z.B. wurden mit senkrecht eingebauten Säulen und Spritzenentleerung über der Säulenpackung kleinere Trennstufenzahlen mit spezifisch schwereren Lm erhalten.

Die Probenkonzentrationen sollten in der Regel nicht zu hoch sein. Andernfalls ist zu befürchten, daß das Trennsystem am Start derart überladen wird, daß die resultierende Bandenverbreiterung größer wird als bei einem zu großen Probenvolumen. Bei schwer löslichen Probensubstanzen kann es vorkommen, daß diese trotz ausreichender Löslichkeit im Probenvolumen ausfallen. Die Folge sind schwer reproduzierbare, zu kleine Peakflächen, denen eine lange Zeit erhöhte, unruhige Grundlinie nachfolgt*).

Hohe Probenkonzentrationen lassen sich in der LC fast immer vermeiden, da das Probenvolumen - im Gegensatz zur GC - sehr viel größer sein darf. Nach einer Faustregel sollte es nicht größer als 1/3 des Peakvolumens des schmalsten (interessierenden) Peaks sein[33,143b], das sind z.B. 70 µl für die Trennung

---

*) Derartiges wurde beobachtet bei der Chromatographie von Prednisolonacetat auf Kieselgel mit dem Fm Petroläther-Diäthyläther, 50 + 50. Allerdings wurde in diesem Fall nicht das Probenvolumen geändert, sondern das chromatographische Milieu. Fm mit chlorierten Kohlenwasserstoffen besitzen bei gleicher Fm-Stärke (auf Kieselgel) eine bessere Löslichkeit für die Corticosteroide.

in Abb. 4-20; bei anderen oben beschriebenen Trennungen mit größerer Säulenlänge oder gröberem Korn wären noch größere Probenvolumina zulässig gewesen.

Für die folgenden Bestimmungen wurden 5 µl Spritzen verwendet; - das Schleusensystem des hp 1010 A läßt sich nur mit 5 und 25 µl Spritzen benutzen. Die Probenkonzentration kann also, besonders wenn mit dem RI-Detektor gearbeitet wird, nicht beliebig klein sein. die interessierenden sauerstoffhaltigen Terpene besitzen jedoch in unpolaren Lm (z.B. Heptan), wie auch in den für die RP-Chromatographie verwendeten Methanol-Wasser-Mischungen eine ausreichende Löslichkeit, so daß oben erwähnte Störungen des chromatographischen Prozesses nicht beobachtet wurden. Bei den beim Verdünnen einiger Öle auftretenden Trübungen dürfte es sich um während der Lagerung entstandene Polymerisationsprodukte gehandelt haben, teilweise auch um Mono- oder Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe, die in Methanol-Wasser in höherer Konzentration schwer löslich sind.

4.3.4.2 Art und Genauigkeit der Probendosierung[33,36,37,39,139,140,145,146]

Sieht man von automatischen Injektionssystemen ab, die erst seit 2 bis 3 Jahren auf dem Markt sind, so kommen für die manuelle Probenaufgabe Spritzen oder Probenschleifen in Betracht. Mit Spritzen sind höhere Trennstufenzahlen erreichbar, wenn die Probe direkt oben in die Mitte der Säulenpackung gegeben wird. Dabei besteht jedoch die Gefhar, daß das Packungsbett zerstört, und die Spritzenkanüle durch Trägermaterial verstopft wird. Ein weiterer Nachteil der Spritzendosierung ist, daß bei Verwendung von Septa Teile aus demselben ausgestochen werden, die die nachfolgenden Wege verlegen. Dies kann zu Turbulenzen und damit zu Bandenverbreiterung (Peaktailing) und zu höheren Eingangsdrucken führen. Ähnliche Störungen werden aber auch bei Probeschleifen oder bei dem benutzten Spritzen-

typ durch Teflonabrieb verursacht. Undichtigkeiten sind allgemein bei Spritzen mehr zu befürchten als bei Probenschleifen. Bei letzteren kann es vorkommen, daß sie sich nur schwer bewegen lassen, was zu zeitweisem Druckanstieg führt. Spritzen sind leichter und, wenn nur kleine Probenvolumina zur Verfügung stehen, gründlicher zu spülen als Probenschleifen - einschließlich der zum Füllen der Schleifen verwendeten Spritzen.

Für Routineanalysen werden allgemein Probenschleifen bevorzugt, denn die Streuungen, besonders der Peakhöhen sind aufgrund der Literatur[37] kleiner und die quantitativen Ergebnisse sind weniger vom Personal abhängig. Auch können größere Volumen dosiert werden; dadurch wird der Volumenfehler kleiner und die Probenvorbereitung eventuell vereinfacht. Schließlich sind große Probenvolumen wichtig bei Spurenanalysen.

Für die folgenden Bestimmungen wurden in Verbindung mit der Schleuse des Flüssigchromatographen hp 1010 A Kolben-in-der-Kanüle Spritzen verwendet. Damit entfallen die Nachteile der Spritzeninjektion durch Septa. Undichtigkeiten sowohl der Schleuse wie auch der Spritze können auch bei hohen Drucken ausgeschlossen werden, solange jene in einwandfreiem Zustand sind. Da sich aber die zum Dichten verwendeten Teflonteile abnutzen, müssen sie von Zeit zu Zeit fester angezogen bzw. erneuert werden. Die beim Öffnen und Schließen der Schleuse entstehenden Druckänderungen stören die Konstanz der Retentionszeiten nicht. Sie machen sich bei ein-Pumpen-Betrieb und bei kurzen Säulen mit geringen Widerständen nur bei RI-Detektion bemerkbar.

Über die Präzision der Probendosierung in der LC werden in Monographien nur selten genaue Angaben gemacht. Häufig liegen die Streuungen zwischen $\pm$ 1 bis 5 %, relativ[37,141], für einige automatische Dosiersysteme werden auch relative Standardabweichungen von besser $\pm$ 1 % und besser $\pm$ 0,5 % vom Hersteller angegeben[146]. Da die Streuung der Probendosierung anhand der registrierten Peaks ermittelt wird, enthält sie auch alle anderen Streuungen des Systems, wobei u.U. die Peakgrößenmes-

sung bei kleinem Signal-Rausch-Verhältnis am stärksten zur Gesamtstreuung beitragen kann.

Die Genauigkeit der Peakgrößen-Bestimmung ist unterschiedlich, je nachdem, ob Peakflächen oder Peakhöhen und ob manuell oder elektronisch gemessen wird. Die Streuungen der mittels Integrator gefundenen Peakflächen und besonders der daraus berechneten %-Flächen sind abhängig von der Genauigkeit und Richtigkeit der Peakerkennung und damit vom Grundlinienrauschen. Streng genommen gelten daher die unten gefundenen Werte u.a. nur für dieses Fördersystem mit dieser Pulsationdämpfung bei dieser Durchflußrate und bei diesem Druck, für diese Detektorempfindlichkeit, für diese UV-Durchlässigkeit des Fm, für diese Wellenlänge, für eine D_2-Lampe derselben Alterung und für Integratoren, die ähnliche Schwierigkeiten haben mit dem Grundlinienrauschen fertig zu werden.

Die folgenden Messungen wurden durchgeführt, um die Genauigkeit der vorhandenen Dosiervorrichtung inclusive des persönlichen Dosierfehlers kennenzulernen. Mit einer 5 µl Spritze wurden nacheinander 5, 3 und 1 µl einer Lösung mit Pulegon, Citral und Piperiton je 10 bis 12 mal auf die Säule gegeben. Abb. 4-22 zeigt einen Ausschnitt der Trennungen, die mit 3 µl Probenvolumen erhalten wurden. Das Fm wurde nur mit einer Pumpe gefördert, der Pumpenhub blieb während des Meßzeitraums konstant. Die Säule war mit mehr als 300 Säulentotvolumen konditioniert worden, dennoch nahmen die Retentionszeiten im Verlauf von 2 1/2 Stunden kontinuierlich um etwa 2 % ab. Die Retentionszeiten von kurz aufeinanderfolgenden Analysen streuten um weniger als 0,01 min, für Piperiton sind das weniger als 0,05 %. Die Abschwächung des Detektorsignals war bei allen Messungen gleich. Auf diese Weise wurden systematische Fehler vermieden, die mit einer Änderung der Verstärkung verbunden sein können. Allerdings verschlechtert sich damit die Meßgenauigkeit der kleineren Peakhöhen bei manueller Auswertung. Bei den elektronisch integrierten Peakflächen ist

keine Abhängigkeit der Präzision von der Detektorsignal-Abschwächung zu erwarten. Für den Integrator ist die Genauigkeit der Peakerkennung, also das Signal-Rausch-Verhältnis, von Einfluß.

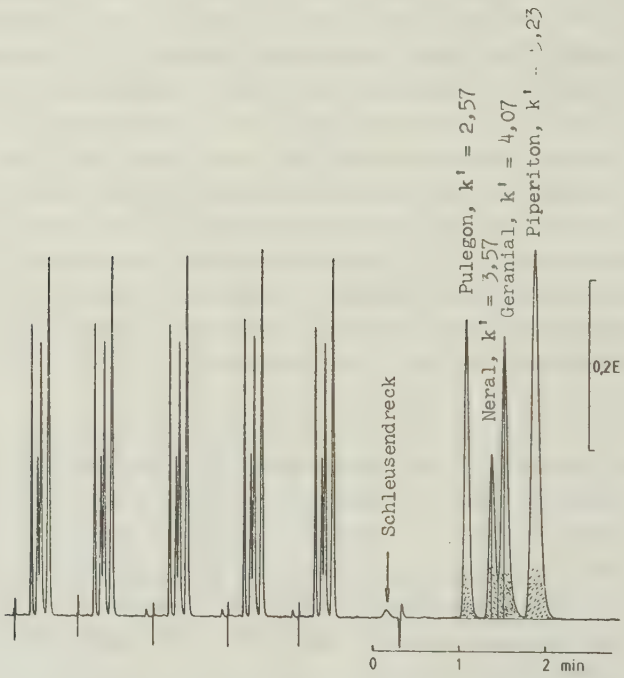


Abb. 4-22: Trennungen von Pulegon, Citral und Piperiton;
je 3 µl der je 0,05 proz. Lösungen in Heptan (= 0,15 nl je Komponente);
LiChrosorb SI 60, 5 µm, 10 cm . 0,3 cm i.D. (wie in Abb. 4-20);
Petroläther + Dioxan, 99 + 1 (V/V), Vorsäule mit mittlerem Wassergehalt wie in Abb. 17a, 2 ml/min, 43 bar mit Vorsäule,
UV 230 nm, 1,0 E; Papiergeschwindigkeit: 1/4 bzw. 1 in/min.

In Tab. 4-13 sind die Mittelwerte der Peakflächen und Peakhöhen sowie die relativen Standardabweichungen, s_{rel}, für Neral, Geranial, Citral und Piperiton wiedergegeben. Die Werte für Pulegon wurden nicht verwendet, nachdem sich gezeigt hatte, daß die relativ stärkere Streuung dieser Werte besonders bei den ersten 10 Analysen ($s_{rel} = \pm 12$ %) durch Spritzenverunreinigung verursacht wurde. Die Spritze war vorher mit einer

25 proz. Pulegon-Lösung gebraucht worden. Um sie für die jetzt verwendete, 500 mal weniger konzentrierte Lösung zu benutzen, war zehnmaliges Spülen mit der neuen Probenlösung nicht ausreichend.

Die relativen Standardabweichungen der absoluten Peakflächen, die als Maß für die Dosiergenauigkeit verwendet werden können, stimmen für die verschiedenen Substanzpeaks recht gut überein. Wie erwartet ist die Streuung bei 1 µl Probenvolumen am größten ($s_{rel} = \pm 2$ %), die Genauigkeit der Flächen bei 3 und 5 µl ($s_{rel} = \pm 0{,}7$ %) kann als gut bezeichnet werden. Ähnliche Streuungen werden bei den Peakhöhen beobachtet, sofern diese nicht zu klein sind. (Die Peakhöhen bei 1 µl Probenvolumen betrugen maximal 33 mm und wurden nicht ausgewertet.) Die Streuung der Peakhöhen bei 3 µl ist etwas größer als die der entsprechenden Peakflächen; dies scheint jedoch nicht auf eine geringere Meßgenauigkeit der Peakhöhen zurückführbar zu sein, denn dann müßten auch die relativen Peakhöhen, % h, stärker streuen als die entsprechenden relativen Peakflächen, % F.

Die relativen Peakflächen und Peakhöhen sind von der Probendosierung unabhängig. In der Tabelle sind sie als %-Anteile der Summe der Citral- und Piperiton-Werte wiedergegeben. Sie sind ein Maß für die bei interner Standardisierung erreichbare Genauigkeit und enthalten die übrigen Streuungsfehler der Meßanordnung. Den größten Beitrag zu diesen Werten dürfte die Präzision der Peakflächen bzw. Peakhöhenmessung liefern. So nehmen z.B. die Streuungen der %-Flächen des Citrals und des Piperitons mit abnehmender Probenmenge, also zunehmendem Signal-Rausch-Verhältnis, deutlich zu: von $\pm$ 0,04 % nach $\pm$ 0,25 % bei einer Abnahme der Peakflächen um das 5 bis 6-fache. Hierbei wurde bei einer Detektorempfindlichkeit von 1,0 E (= Schreibervollausschlag) gearbeitet. Bei noch schlechterer Detektierbarkeit sind bis zu 10 mal so große Standardabweichungen nicht auszuschließen[141].

Tabelle 4-13: Mittelwerte der Peakflächen, F (mVs), der Peakhöhen, h (mm), der relativen Peakflächen, % F, und der relativen Peakhöhen, % h, von Neral, Geranial, Citral und Piperiton und die bei n = 10 bis 12 gefundenen relativen Standardabweichungen (in %). Die rel. Werte (% F und % h) beziehen sich auf die Summe des Citral + Piperiton-Wert (= 100 %)

Probenvolumen	5 µl	3 µl	1 µl
F_{Ner}	15,81 ± 0,70 %	9,40 ± 0,82 %	2,71 ± 2,14 %
F_{Ger}	31,19 ± 0,68 %	18,59 ± 0,55 %	5,40 ± 2,00 %
F_{Citr}	47,00 ± 0,67 %	27,98 ± 0,61 %	8,11 ± 2,04 %
F_{Pip}	47,88 ± 0,69 %	28,70 ± 0,57 %	8,37 ± 1,97 %
h_{Ner}	80,00 ± 0,62 %	47,90 ± 1,38 %	
h_{Ger}	137,04 ± 0,76 %	82,35 ± 1,27 %	
h_{Citr}	217,04 ± 0,71 %	130,25 ± 1,29 %	
h_{Pip}	176,79 ± 0,78 %	107,80 ± 1,24 %	
% F_{Ner}	16,66 ± 0,23 %	16,57 ± 0,38 %	16,47 ± 0,31 %
% F_{Ger}	32,88 ± 0,11 %	32,79 ± 0,07 %	32,76 ± 0,32 %
% F_{Citr}	49,54 ± 0,04 %	49,37 ± 0,10 %	49,22 ± 0,25 %
% F_{Pip}	50,46 ± 0,04 %	50,63 ± 0,10 %	50,78 ± 0,24 %
% h_{Ner}	20,31 ± 0,14 %	20,12 ± 0,24 %	
% h_{Ger}	34,79 ± 0,05 %	34,60 ± 0,22 %	
% h_{Citr}	55,11 ± 0,05 %	54,71 ± 0,09 %	
% h_{Pip}	44,88 ± 0,06 %	45,29 ± 0,11 %	

Die geringere Genauigkeit der %-Flächen von Neral und Geranial gegenüber der von Citral und Piperiton könnte mit der unvollständigen Auflösung der beiden Diastereomeren erklärt werden, d.h., bei geringen Schwankungen der Retentionszeit und/oder der Peakbreite wird die Fläche des einen Isomers kleiner und die des anderen größer, während die Summe aus beiden unbeeinflußt bleibt. Die etwas geringeren Streuungen der %-Höhen der beiden Isomeren (bei 5 µl Probenvolumen) können ebenso erklärt werden. Die Peakhöhen werden, besonders bei unsymmetrischen und

verschieden hohen Peaks, durch unvollständige Auflösung weniger gestört als die Peakflächen. Abb. 4-22 zeigt, daß das Tailing des Nerals in etwa zu Ende ist, wenn der Geranial-Peak sein Maximum erreicht.

Die relativen Standardabweichungen der %-Höhen und %-Flächen der vollständig getrennten Substanzen Citral und Piperiton unterscheiden sich praktisch nicht, was auf eine - bei diesem Signal-Rausch-Verhältnis - etwa gleich gute Meßgenauigkeit des Integrators schließen läßt.

Zur Richtigkeit der Werte sei noch erwähnt:
Die %-Höhen sind natürlich nicht vergleichbar mit den %-Flächen. Erst aus den Produkten Peakhöhe mal Peakbreite oder Peakhöhe mal Retentionszeit lassen sich ähnliche %-Werte errechnen. Die relativen Peakflächen dürften keine Abhängigkeit von der Probenmenge zeigen. Mit kleiner werdendem Probenvolumen nehmen sie jedoch für Citral ab und für Piperiton zu: um 0,6 %, relativ, bei einer Änderung des Probenvolumens von 5 auf 1 µl. Ähnlich verhält es sich bei den %-Höhen. In beiden Fällen sind die Änderungen der %-Werte mit dem Probenvolumen größer als der Vertrauensbereich, welcher bei n = 10 für 95 % statistische Sicherheit etwa halb so groß ist wie die in der Tabelle angegebenen relativen Standardabweichungen. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann nicht mit Sicherheit gegeben werden. Auf jeden Fall zeigt dieses Beispiel, daß - besonders bei hohen Ansprüchen an die Genauigkeit und Richtigkeit - die Probenkonzentrationen nur in engen Grenzen schwanken sollten, da die sonst entstehenden systematischen Fehler leicht größer als der Streuungsfehler der Probendosierung werden können.

Schließlich ergibt sich für das unvollständig aufgelöste Substanzpaar Neral-Geranial aus den Mittelwerten der Peakflächen (für 5 µl Probevolumen) ein Verhältnis von 33,6 : 66,4 und aus den Mittelwerten der Produkte aus Peakhöhe mal Retentionszeit ein Verhältnis von 34,4 : 65,6. Da die Peaks ungleich hoch und unsymmetrisch sind, muß das aus den Peakhöhen errechnete

Isomerenverhältnis richtiger sein. Für den Vergleich der LC-Werte mit den GC-Werten (s. 3.3.3) ist zu berücksichtigen, daß sich die Extinktionen von Neral und Geranial bei etwa gleicher Wellenlänge wie 95 : 100 (s. Tab. 2-1) verhalten.

4.3.4.3 Eigenschaften der für quantitative Bestimmungen verwendeten Fm

Allgemein werden in der HPLC möglichst niedrig viskose Fm verwendet, um die Säulenvordrucke klein zu halten, und um mehr Trennstufenzahlen - besonders bei hohen Fließgeschwindigkeiten - zu erhalten. In der Regel besitzen aber niedrig-viskose Lm größere kubische Wärmeausdehnungskoeffizienten[147], größere Komprimierbarkeiten[147] und höhere Dampfdrucke. Kleine kubische Wärmeausdehnungskoeffizienten der Fm ermöglichen insbesondere bei temperaturempfindlichen Detektoren ein geringeres Grundlinienrauschen und zusammen mit geringen Komprimierbarkeiten der Lm eine bessere Konstanz der Durchflußrate (besonders bei Langhubkolbenpumpen). Niedrigsiedende Lm stören nicht nur durch Gasbildung in den Zuleitungen zu den Pumpen, sie führen auch zu größeren Arbeitsplatzkonzentrationen und erhöhen damit das Risiko für die Gesundheit und die Explosionsgefahr. Schließlich ist die Fm-Zusammensetzung mit niedrigsiedenden Lm schwerer konstant zu halten, zumal wenn diese während des Betriebes oder über Nacht in nicht völlig verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden.

Es kann also bei quantitativen Analysen zu Gunsten der von-Tag-zu-Tag Wiederholbarkeit vorteilhaft sein, höhersiedende Lm zu verwenden (> 80°), auch wenn dadurch der Säulendruck erhöht und die Trennleistung der Säule etwas verringert wird. Bei den verwendeten unpolaren LSC-Fm würde sich z.B. der Austausch von Petroläther 50/70° durch Heptan, Isooctan oder Petroläther 100/125° anbieten. Die chromatographische Selektivität dürfte dadurch nur sehr wenig beeinflußt werden. Im

folgenden wurde jedoch weiterhin die niedriger siedende Petroläther-Fraktion verwendet, da sie eine etwas bessere UV-Durchlässigkeit bei den für diese Untersuchungen wichtigen kurzen Wellenlängen besitzt. In der RP-Chromatographie könnte wegen der geringeren Wärmeausdehnung und der geringeren Komprimierbarkeit der meist wasserhaltigen Fm die Konstanz der Retentionszeiten besser sein als in der LSC.

4.3.4.4 Genauigkeiten der Durchflußrate, der Fm-Zusammensetzung, der relativen Wassersättigung, der Temperaturen des Fm-Vorrats, der Pumpen, der Raumluft und der Säule

Oben waren die Genauigkeit der Probendosierung untersucht und Anhaltspunkte für die Genauigkeit der Peakgrößenmessung erhalten worden. Die im folgenden diskutierten Faktoren sind wichtig für die Wiederholbarkeit der Trennbedingungen. Sie tragen ebenfalls zur Streuung der Ergebnisse bei, bewirken aber in stärkerem Maße Langzeitschwankungen der Peakflächen, Peakhöhen, Retentionszeiten oder gar der Trennung und führen daher auch zu systematischen Fehlern.

Die in der Literatur genannten Genauigkeiten der einzelnen Trennparameter können je nach LC-Methode (LSC, RP-LSC, LLC, IEC oder GPC) und Art der Peakgrößen-Messung verschieden sein. Scott et al.[148] verlangen z.B., daß die Fm-Zusammensetzung auf $\pm$ 0,02 %, die Temperatur der mobilen Phase und der Säule auf $\pm$ 0,02 % und die Raumtemperatur, die die Temperatur der Pumpen beeinflußt, auf $\pm$ 0,4° C kontrollierbar sind, wenn die beobachteten relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten von $< \pm$ 0,1 %, der Trennstufenzahl von ca. $\pm$ 1,0 % und der Peakhöhen von $< \pm$ 0,5 % wiedergefunden werden sollen. (Diese Untersuchung wurde auf Kieselgel mit 44 % Butylchlorid in Heptan (G/V) als Fm bei 1 µl Probenvolumen (Schleife), einer Probenmenge von 0,05 µg/g Kieselgel und bei einer Fördergenauigkeit der Pumpe von $\pm$ 0,07 % ausgeführt.)

Für die eigenen Untersuchungen wird eine teilweise geringere Präzision insbesondere der Temperaturen und der Durchflußrate, die nicht so gut konstant gehalten werden konnten, erwartet. Im folgenden seien die in etwa erreichbaren Genauigkeiten einiger Parameter und ihr Einfluß auf das quantitative Ergebnis beschrieben.

Ein HPLC-Fördersystem[30,33,36-39,142,145,149,150] soll nicht nur einen möglichst geglätteten Fm-Strom liefern, der entsprechend hohe Detektorempfindlichkeiten und ein nahe der Nachweisgrenze noch relativ genaues quantitatives Arbeiten erlaubt, sondern auch eine sehr gute Konstanz und Wiederholbarkeit der Durchflußrate aufweisen. Denn im Gegensatz zur GC sind fast alle bekannten LC-Detektoren (ausgenommen z.B. Adsorptions-Detektoren) konzentrationsspezifisch, d.h. die Genauigkeit der Durchflußrate beeinflußt bei Peakflächenauswertung unmittelbar das quantitative Ergebnis.

Die Fördergenauigkeit vieler Pumpen wird mit besser $\pm$ 1 %[149] angegeben. (Für die verwendete Orlita[151]-Pumpe DMP 1515/3 waren keine entsprechenden Angaben auffindbar.) Häufig wurde in den ersten Stunden nach Einschalten des Gerätes bei unverändertem Kolbenhub eine Abnahme der Förderleistung und des Vordrucks um 1 bis 2 % beobachtet. Dies wurde auf eine Erwärmung der Pumpenköpfe und auf die damit verbundene Ausdehnung der Fm zurückgeführt. Bei den quantitativen Arbeiten wurde daher der Pumpenraum mit einem weiteren Ventilator luftgekühlt. Die Umgebungstemperatur bleibt bei eingeschalteter Raumlüftung dank der Klimatisierung des Hauses und des Ausschlusses von Sonneneinstrahlung relativ gut konstant (20 - 22° C). Noch größere Abweichungen der Durchflußrate können bei festgestelltem Kolbenhub entstehen, wenn sich unlösliche Bestandteile (Abrieb, Septumpartikel, suspendierte Teilchen aus der Probenlösung oder aus dem Fm) am Säulenkopf absetzen und damit die Durchlässigkeit der Säule verringern, oder wenn die Säule Temperaturschwankungen ausgesetzt ist, wodurch Viskosität und Dichte des Fm verändert werden. Schließlich wird die Genauigkeit der Durchflußrate durch die Abnutzung der Pumpenteile beein-

flußt. Dabei ist z.B. die durch eine einseitig lädierte Ventilkugel verursachte Nicht-Konstanz von der Lage derselben im Kugelventil abhängig, - eine Änderung also nicht vorhersagbar.

Bei nicht konstantem Vordruck kann es, wenn das Fm-Gemisch auf der Hochdruckseite mit Hilfe der beiden Pumpen hergestellt wird, zu Schwankungen der Fm-Stärke kommen, welche wie die Temperatur die k'-Werte und damit das quantitative Ergebnis bei Peakhöhen-Auswertung beeinflussen. Durch wechselnde Fm-Zusammensetzung kann wiederum die Viskosität des Fm und damit die Durchflußrate verändert werden. Dies ist besonders kritisch bei Gradienten-Elution, die allgemein nur mit Zugeständnissen an die Richtigkeit und Genauigkeit bei quantitativen Analysen eingesetzt wird. Aber auch unter isokratischen Bedingungen wurden stärker streuende Retentionszeiten gefunden, wenn das Fm auf der Hochdruckseite gemischt wurde. Besonders ausgeprägt war dies bei Fm, die aus Lm mit unterschiedlicher Viskosität hergestellt werden, z.B. bei Methanol-Wasser-Gemischen (Tab. 4-14). Jene ändern ihre Viskosität nicht linear mit dem Mischungsverhältnis, sondern weisen bei etwa 40 % (V/V) Methanol in Wasser eine maximale Viskosität auf, die mehr als zweimal so groß ist wie der Mittelwert aus den Viskositäten von Methanol und Wasser[152].

Die Schwankungen der Fm-Stärke beim Mischen von Methanol und Wasser auf der Hochdruckseite wurden auch vom RI-Detektor deutlich angezeigt. Sie waren teilweise so groß, daß sich bei geringster Empfindlichkeit die Ri-Grundlinie bis zur halben Schreiberbreite auf und ab bewegte. Als Ursache für diese Nichtkonstanz kann eine zu große Mischkammer angenommen werden, aber auch eine nichtkonstante Freigabe der beiden Lm aus den Dämpfungsvolumina der Pumpen (Volumen der Lm und Volumen des zum Dämpfen verwendeten Hexans) kann vermutet werden, da die Schwankungen auch vom Säulenvordruck abhängig waren.

Tabelle 4-14: Genauigkeiten der Retentionszeiten beim Mischen des Fm aus Methanol und Wasser a) auf der Hochdruckseite und b) auf der Niederdruckseite

a) Pulegon: 3,70 min ± 1,9 % (n = 10)

je 50 nl auf LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm · 0,3 cm i.D., 2 ml/min, 50 % (V/V) Methanol, auf der Hochdruckseite gemischt, 60° Säulentemperatur, 120 bar, k' = 4,3.

b) Cineol: 4,35 min ± 0,17 % (n = 18)

je 180 nl, Säule, Säulentemperatur und Fm-Stärke wie oben, Fm auf der Niederdruckseite gemischt und mit einer Pumpe gefördert, 2 ml/min, k' = 5,2.

Es ist also für quantitative Bestimmungen günstiger, das Fm vor der Pumpe herzustellen und mit nur einer Pumpe zu fördern. Dies gilt auch für lipophile Lm, die allgemein geringere Viskositätsänderungen durch das Mischen erfahren als Fm aus Wasser und sauerstoffhaltigen organischen Lm. Durch das Mischen der Fm auf der Niederdruckseite wird weiter ausgeschlossen, daß Wärme oder Kälte, die beim Mischen der Lm entstehen können, die Trennungen beeinflussen. Außerdem wird bei RI-Detektion die Grundlinie durch das Öffnen und Schließen der Schleuse weniger gestört als beim Mischen des Fm auf der Hochdruckseite. Schließlich erlaubt die mit Ein-Pumpen-Betrieb erreichbare Konstanz der Fm-Stärke eher eine Auswertung der Chromatogramme nach der Peakhöhe, welche bei unaufgelösten Peaks richtiger und bei schlechter Förderkonstanz genauer sein kann als die Peakflächenauswertung. Vorausgesetzt, daß die Temperatur der Säule und die stationäre Phase gleich bleiben.

Die Säulenthermostatisierung[30,36,37,148,153] erfolgt bei dem verwendeten Gerät durch Luftumwälzung. Diese ist aber nur bei höherer Temperatur einsetzbar. Für die LSC-Trennungen auf polarer stationärer Phase, die praktisch nur bei Raumtemperatur durchgeführt werden, gilt die Temperaturkonstanz der Umgebung. Durch den Säulenofen wird die Säule also nur gegen Zugluft geschützt. Da die Wasserbelegung des Sorbens und damit die k'-Werte in der LSC stark temperaturabhängig sind, wird für die

LSC allgemein eine höhere Konstanz der Säulentemperatur gefordert. Diese ist besser durch Flüssig- als durch Lufthermostatisierung erreichbar. Es werden daher für die Trennungen auf Kieselgel mit den vorhandenen Möglichkeiten über lange Zeiträume größere Streuungen der Retentionszeiten erwartet als z.B. für RP-Trennungen bei 60° Säulentemperatur.

Wie aus Abb. 4-16 hervorgeht, ändert sich mit der Wasserbelegung des Kieselgels 60 von 20 % auf 13 % der log k' der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen im Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, etwa um 0,15, entsprechend einer k'-Wert-Änderung um das 1,4-fache. Nimmt man an, daß sich die Wassersorptionsisothermen des Kieselgels 60 mit dem Fm Benzol[85)] und dem Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, in etwa entsprechen, so würde mit einer Änderung der Belegung des Kieselgels 60 von 20 % auf 13 % Wasser eine Änderung des Wassergehalts der mobilen Phase von etwa 0,004 % einhergehen. Sollen die Retentionszeiten auf ± 10 % (!) genau wiederholbar sein, dürfte der Wassergehalt des Fm (vermutlich < 0,04 %) nur um ± 0,001 % schwanken.

Fm mit so geringem Wasserlösungsvermögen durch Mischen von getrocknetem und wassergesättigtem Fm wiederholbar und genau einzustellen, erschien nicht erfolgversprechend. Einmal sind völlig trockene Fm schwer herzustellen und verändern leicht ihren Wassergehalt (bei trockenen unpolaren Lm, wie z.B. Hexan, kann Umfüllen in ein anderes Gefäß genügen, um die relative Wassersättigung deutlich zu verändern[154)]), zum anderen ist die Herstellung 100-%-wassergesättigter Fm unsicher, da die Gleichgewichtseinstellung langsam erfolgt, und die gelöste Wassermenge temperaturabhängig ist. Auch besteht die Gefahr, daß polare Fm-Komponenten teilweise in überschüssiger wäßriger Phase gelöst werden. Schließlich wären Wasserkonzentrationen auf 10 µl/l genau schwer zu kontrollieren, z.B. durch Karl-Fischer-Titration.

Bei den quantitativen Bestimmungen auf Kieselgel wurde daher der Wassergehalt des Fm allenfalls ungefähr eingestellt und erst mit Hilfe von Vorsäulen auf eine definierte mittlere relative Wassersättigung gebracht. Hierzu wurde wie zuvor Kieselgel 60, 40 - 63 µm verwendet, das möglichst in einem Guß und trocken in die Säulen gefüllt und bei Bedarf erneuert wurde. Dieses Verfahren hat neben der besseren Wiederholbarkeit der Retentionszeiten - auch nach Erneuern des Fm im Vorratsgefäß - den Vorzug, daß die u.U. langwierige Herstellung von trockenen und 100 proz. wassergesättigten Fm vermieden werden kann. Daneben dienen die Vorsäulen als Wärmeaustauscher und auftretende Temperaturschwankungen verändern den Wasserbelegungsgrad der analytischen Säule weniger als beim Arbeiten ohne Vorsäule (wohl aber die k'-Werte). Der Vordruck wird in Verbindung mit 5 oder 10 µm Säulen nur unwesentlich erhöht. Auch wenn das Trocknen von Kieselgel schlecht reproduzierbar sein sollte[155], so kann doch die Wiederholbarkeit der Analysen über einen langen Zeitraum gesichert werden, da z.B. eine Menge von 100 g Kieselgel mit + 13 % Wasser ausreichend sein dürfte, um mehr als 30 l trockenes Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, auf eine mittlere Wassersättigung einzustellen. Im übrigen ist die zur Wassersättigung des Fm benötigte Kieselgelmenge leichter aufzubewahren als die entsprechende Menge an wassergesättigtem Fm.

Zur Genauigkeit und Konstanz der Fm-Zusammensetzung sei erwähnt: Bei den Methanol-Wasser-Gemischen der RP-Chromatographie ändern sich mit dem Methanolgehalt um ± 1 % (= 2 % relativ) die k'-Werte um etwa 10 % (Tab. 4-7). Ähnliche Streuungen der k'-Werte verursachen in der Chromatographie auf Kieselgel Ungenauigkeiten des Dioxangehalts von ± 0,15 % (= 15 % relativ) beim Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, (Tab. 4-9) und Ungenauigkeiten des Methanolgehalts von ± 0,02 % (= 16 % relativ) beim Fm Petroläther-Methanol, 100 + 0,125 (Tab. 4-11). Bei den in der LSC verwendeten Fm ist es daher notwendig, die stärker eluotrope Fm-Komponente mit Vollpipetten oder durch genaues Wiegen abzumessen. Nach dem Mischen müssen diese Fm möglichst verschlossen aufbewahrt werden und dürfen auf keinen Fall durch Anlegen von Vakuum entgast werden, da Kohlenwasserstoffe mit vielen

polaren Lm niederiger siedende Azeotrope bilden*), d.h. der relative Gehalt der polaren Fm-Komponente würde sehr rasch absinken.

Es sei schließlich nicht verschwiegen, daß, wie auch aus den gezeigten Chromatogrammen und Tabellen hervorgeht, die k'-Werte bis zu ± 10 % streuten, wenn die Trennbedingungen völlig neu eingestellt werden mußten. Teilweise war dies auf unterschiedlich hergestelltes Kieselgel in der Vorsäule oder unterschiedliche Oberflächen der Säule je nach Korngröße oder Chargennummer, teilweise auf Dioxan mit unterschiedlicher Vorbehandlung zurückzuführen. In der RP-Chromatographie wurden unterschiedliche Fm-Stärken gefunden, je nachdem ob mit Hilfe der Pumpen auf der Hochdruckseite oder ob dieselben Volumina mit Hilfe von Meßzylindern vor der Pumpe gemischt wurden.

Solange durch diese Ungenauigkeiten der Zusammensetzung der mobilen oder der stationären Phase die Trennung nicht verloren geht, und solange die Verringerung dieser Fehler nur mit großem Aufwand erreicht werden kann, erscheint es bei Flächenauswertung nicht lohnenswert auf eine bessere Wiederholbarkeit hinzuarbeiten.

Im übrigen ist die stationäre Phase in der GC, also das Neubelegen von Trägermaterial, kaum besser reproduzierbar. Nur macht sich dies in der Praxis e i n e s Labors weniger bemerkbar, da die mobile Phase die Zusammensetzung der stationären Phase praktisch nicht beeinflußt, und da bei geringer Stabilität der GC-Phasen eine entsprechend größere Menge an Säulenfüllmaterial hergestellt und vorrätig gehalten werden kann.

---

*) z.B. siedet Hexan bei 69° und Hexan-Methanol, 73 + 27, bei 50° (bei 760 Torr)

4.3.4.5 Stoffveränderungen[33,37]

Zersetzungen werden in der HPLC sehr viel seltener beobachtet als in der konventionellen SC oder DC. Hauptgründe hierfür mögen sein, daß die Trägermaterialien eine größere Reinheit besitzen, und daß die Probe nur mit völlig benetztem Träger in Berührung kommt, also kleinere Sorptionswärmen, kein Eintrocknen der Substanzzonen und Ausschluß von Luftsauerstoff. Stoffveränderungen sind in der HPLC zu befürchten, wenn mit nicht desaktivierten Sorbenzien gearbeitet wird, oder Stoffe chromatographiert werden, die gegen Spuren von Metallen empfindlich sind, z.B. Tetracycline.

Für die Inhaltsstoffe der ätherischen Öle können Zersetzungen auf der Säule praktisch ausgeschlossen werden, nachdem auf wasserfreiem Kieselgel 60 mit dioxanhaltigem Petroläther bei Raumtemperatur für das empfindlichere Citral kein geringerer Gehalt gefunden worden war (s. 4.3.3.8). Stoffveränderungen durch im Fm gelösten Luftsauerstoff erscheinen bei RT unwahrscheinlich, zumal dieser durch Entgasen der Fm mit Ultraschall weitgehend entfernt wird. Zersetzungen bei ätherischen Öl-Proben dürften also eher in der Aufbewahrung der Probenlösungen als in der vergleichsweise kurzen Verweildauer der Probe in der HPLC-Säule zu suchen sein (s.a. GC 3.3.3).

4.3.4.6 Beladbarkeit des chromatographischen Systems und linearer Bereich der Detektoren

Bei den GC-Untersuchungen mit dem FID, der einen sehr großen linearen Bereich von 10^7 aufweist[z.B.58], konnte in Verbindung mit 1/8 in Säulen praktisch nur die stationäre Phase aber kaum der Detektor überladen werden. Es erschien aber in der GC ohne weitere Voruntersuchungen erlaubt, die Probenkonzentration möglichst klein zu wählen aber groß genug, um Fehler der elektronischen Integration durch Rauschen oder Drift der Grundlinie zu vermeiden (s.a. 3.3.1 und 3.3.4).

In der LC ist es dagegen bei der meist geringeren Empfindlichkeit und Linearität der Detektoren angebracht, zuvor den "Arbeitsbereich" kennenzulernen, in dem sich die Probenmengen unter den jeweiligen Trennbedingungen bewegen dürfen. Als Arbeitsbereich sei jener Bereich definiert, der zwischen maximaler linearer Detektoranzeige bzw. maximaler Beladbarkeit des Systems und der kleinsten noch störungsfrei und hinreichend genau bestimmbaren Probenmenge liegt. Wird dieser Bereich überschritten, so ist mit Verlust an Auflösung infolge Überladung der stationären oder mobilen Phase, mit zu kleinen Werten infolge Überladung des Detektors oder mit stärker streuenden, schlecht zu integrierenden Werten wegen eines ungünstigeren Signal-Rausch-Verhältnisses zu rechnen.

Ein Beispiel für den Einfluß der Beladbarkeit des Systems und der Detektoranzeige des UV- und RI-Detektors auf den Arbeitsbereich ist in Abb. 4-23 wiedergegeben. Die abgebildeten Kurven wurden auf LiChrosorb SI 60 mit dem Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, bei mittlerer Wassersättigung für Piperiton erhalten. Es zeigt sich, daß bis zu einer Menge von 0,14 mg/g Träger die Peakbreite nicht zunimmt, also kein Verlust an Trennung eintritt, und daß die Säule bis zu 1 mg Piperiton/g Träger beladen werden kann, ehe die Retentionszeiten um mehr als 10 % abnehmen*).

Weiter zeigt die Abb. 4-23 Unterschiede der beiden Detektoren bezüglich der Empfindlichkeiten und damit der Arbeitsbereiche. Der RI-Detektor, der etwa 1000 mal unempfindlicher ist als der UV-Detektor, beginnt erst bei Probenmengen zuverlässig zu arbeiten, bei denen der UV-Detektor das Maximum der linearen Anzeige überschreitet. Beide Detektoren besitzen mit $5 \cdot 10^{-3}$z.B einen etwa gleich großen linearen Bereich. Während es sich aber

---

*) Dieser Wert entspricht der Beladbarkeit nach der Snyderschen Definition[28]. Von Rössler[156] z.B. wurde gefunden, daß die Überladung eines Systems besser durch die Zunahme der Bandenverbreiterung charakterisiert wird, und Scott[144] verwendet die Definition nach Klingenberg, der die Beladbarkeitsgrenze bei um 5 % vergrößerten Peakbreiten festsetzt.

mit dem UV-Detektor über mehr als 2 Zehnerpotenzen hinweg bequem arbeiten läßt, ist dieser Bereich bei RI-Detektion nach oben durch die Beladbarkeit des Trennsystems begrenzt, so daß ohne Verlust an Auflösung bei diesen chromatographischen Bedingungen der Arbeitsbereich nur etwas mehr als eine Zehnerpotenz umfaßt.

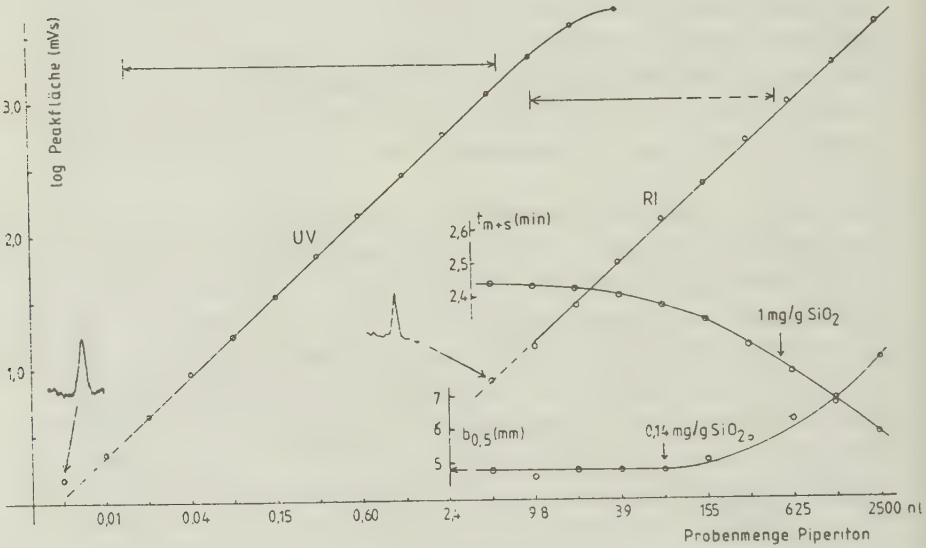


Abb. 4-23: Abhängigkeit der UV- (bei 227 nm) und der RI-Anzeige, der Retentionszeiten und der Peakbreite von der dosierten Menge Piperiton (in 5 µl Probenvolumen), ermittelt auf LiChrosorb SI 60, 10 µm, 15 cm . 0,3 cm I.D., mit dem Fm Petroläther 50/70° + Dioxan, 99 + 1 (V/V), bei mittlerer Wassersättigung, N = ca. 1000, k' = 4,4.

Die Kurven in Abb. 4-23 haben streng genommen nur Gültigkeit für diese chromatographischen Bedingungen, für diese Probensubstanz, für Säulen dieser Dimension und dieser Trennstufenzahl und für Detektoren der verwendeten Bauart. Dennoch erscheint die Abbildung nützlich zur Veranschaulichung der weiteren Überlegungen.

Der Arbeitsbereich (ebenso wie die Detektierbarkeit, nicht aber die Nachweisgrenze*) läßt sich in vorhersehbarer Weise durch Verringerung der Peakbreite nach kleineren Probenmengen verschieben, z.B. durch Elution bei kleineren k'-Werten, durch Säulen gleicher Länge aber höherer Trennstufenzahl oder durch kleinere Volumina der mobilen Phase, z.B. durch kürzere bzw. engere Säulen oder durch Träger mit geringerer Porosität. Außer durch die Peakbreite wird die Detektierbarkeit durch die relative Empfindlichkeit der Detektion beeinflußt, z.B. bei UV-Detektion durch den ε-Wert einer Substanz bei der betreffenden Wellenlänge. Eingeengt ist der Arbeitsbereich a) bei verringerter Linearität des Detektors, z.B. bei UV-Detektion von Substanzen, die nicht dem Lambert-Beer'schen Gesetz gehorchen (häufig bei ε-Werten < 1000) und b) bei der geringeren Empfindlichkeit des RI-Detektors und/oder geringerer Beladbarkeit der Säule.

Die Beladbarkeit ist eine Eigenschaft des chromatographischen Milieus. Sie ist abhängig vom k'-Wert und kann für jede Komponente eines Gemisches verschieden sein. Dies zeigt Abb. 4-24 für die früher verwendeten Trennsysteme anhand einiger Probensubstanzen.

Im dioxanhaltigen Fm (Abb. 4-24a) erfährt bei Pulegon im Gegensatz zum Piperiton nur die Peakbreite eine Änderung mit der Probenmenge, während die Retentionszeit praktisch konstant bleibt. Die Beladbarkeit des Systems ist für Pulegon (k' = 2,2) aufgrund der Peakbreitenänderung etwa doppelt so groß wie für Piperiton (k' = 4,4; Abb. 4-23). Piperiton zeigt bei Überladung tailing während Pulegon in demselben Fm fronting zeigt.

---

*) Die folgenden Nachweisgrenzen wurden für Piperiton bei den Messungen für Abb. 4-23 ermittelt (Signal-Rausch-Verhältnis = 2)
a) bei UV-Detektion (227 nm): ca. 3 ng/ml
b) bei RI-Detektion : ca. 2 µg/ml

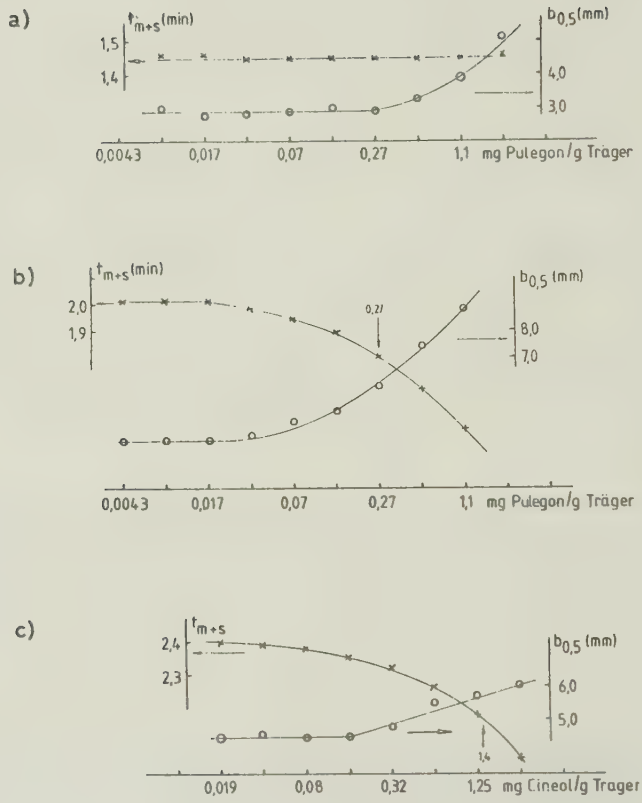


Abb. 4-24: Abhängigkeit der Retentionszeiten (-×-×-) und der Peakbreiten (-o-o-) einiger Probensubstanzen in drei Trennsystemen vom Verhältnis Probenmenge : Träger; Probenvolumen: 5 µl;
a) für Pulegon (k' = 2,2) auf LiChrosorb SI 60 mit dem Fm Petroläther 50/70° -Dioxan-Wasser, Säule und Fm wie in Abb. 4-22;
b) für Pulegon (k' = 3,4) auf LiChrosorb SI 60 mit dem Fm Petroläther 50/70° -Methanol, 100 + 0,125 (V/V), Säule wie bei (a);
c) für Cineol (k' = 2,5) auf LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D., mit dem Fm Wasser-Methanol, 40 + 60 (V/V), 60° Säulentemperatur.

Bei Verwendung des Fm Petroläther-Methanol (Abb. 4-24b) besitzt die stationäre Phase eine 10 mal geringere Beladbarkeit als beim Fm Petroläther-Dioxan-Wasser. Die Abhängigkeit der Retentionszeiten, der Peakbreite und der Peaksymmetrie von der dosierten Pulegonmenge ist ähnlich wie bei Piperiton im dioxanhaltigen Fm (Abb. 4-23).

Abschließend kann gesagt werden: Bei frei wählbarer Probenmenge bereitet die Bestimmung der gut UV-absorbierenden Komponenten selten Schwierigkeiten. Auch wenn z.B. eine der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen zu weniger als 0,1 % im ätherischen Öl vorliegt, braucht die Säule für gute Detektierbarkeit nicht überladen zu werden. Dagegen ist bei RI-Detektion, besonders bei Vielkomponenten-Gemischen, die Probenkonzentration sorgfältig auf die gewählten Trennbedingungen abzustimmen, wenn Verluste an Auflösung infolge Überladung der Säule vermieden werden sollen. Um einen großen Arbeitsbereich des RI-Detektors zu haben, sind Fm-Systeme mit guter Beladbarkeit und großen RI-Differenzen zwischen Probensubstanz und Fm wünschenswert.
Die Bandenverbreiterung kann, ähnlich wie in der Spurenanalyse, nicht klein genug sein. Dies bedeutet kleine Korngrößen, geringe k'-Werte und kleine Durchflußraten. Letztere erlauben neben geringeren Trennstufenhöhen eine bessere Thermostatisierbarkeit des Eluats. Die Säulendimensionen scheinen bei jeweils maximaler Probenmenge (bzw. Probenvolumen) keinen Einfluß auf die Nachweisgrenze zu haben[143b)]. Die bei RI-Detektion relativ großen Totvolumina der Wärmeaustauscher und die damit verbundene größere Bandenverbreiterung außerhalb der Säule lassen allzu kurze Säulen (10 cm) bei RI-Detektion nicht so günstig erscheinen.

Allgemeine Regeln zur Beladbarkeit verschiedener Trennsysteme, wie 10 mal größere Beladbarkeit in der LLC oder RP-LC gegenüber der LSC auf Kieselgel, sind nicht zuletzt aufgrund der obigen Beispiele von begrenztem Wert. Einmal bestehen große Unterschiede bei den RP-Trägermaterialien verschiedener Hersteller[z.B.157)] und zum anderen ist vielen Trennsystemen nicht anzusehen, ob Adsorptions- oder Verteilungsprozesse überwiegen.

4.3.4.7 Weitere Fehler, die bei der Detektion entstehen können[31,33,36,38,142,158,159)]

Im vorhergehenden Abschnitt waren die Folgen der schlechten Detektierbarkeit und der Nichtlinearität der Detektoranzeige angeschnitten worden. Letzteres hat, besonders beim Vergleich von unterschiedlich großen Peaks, systematische Fehler zur Folge, während ein kleines Signal-Rausch-Verhältnis vor allem zu stärker streuenden Werten führt. Das Rauschen ist neben anderen Faktoren auch abhängig von Art und Konstruktion des Detektors, z.B. von der Empfindlichkeit gegenüber Druck-, Durchfluß- oder Temperaturschwankungen und speziell bei UV-Detektoren z.B. von der Lichtausbeute (Spaltbreite, Grundabsorption des Fm) oder dem Alter der Deuteriumlampe.

Im folgenden seien einige weitere, für quantitative Bestimmungen wichtige Eigenschaften der verwendeten Detektoren diskutiert. Ausgeklammert wurde hierbei die Selektivität der Detektoren, deren Einfluß auf das Trennproblem in früheren Abschnitten diskutiert worden ist. Ebenfalls ausgespart blieb die Größe des Zellvolumens[143b)] und die Ansprechzeit der Detektoren[143b)]. Zusammen mit dem Totvolumen zwischen Säule und Detektor und der Ansprechzeit der Registriereinrichtung dürften sie vor allem die Trennung beeinflussen, wobei sich bei kleinen Peakbreiten besonders das Zellvolumen und bei schnellen Analysen (große Trennstufenzahl/Zeit) vor allem die Zeitkonstanten bemerkbar machen. Die Ansprechzeit des Integrators kann einen Einfluß auf die Streuung der Flächenwerte haben[160)].

UV-Detektion[158)]

Das Lambert-Beer'sche Gesetz hat u.a. nur Gültigkeit für monochromatisches Licht und parallele Strahlenbündel. Bei den kleinen Innendurchmessern der LC-Detektorzellen ($\leq$ 1 mm) kommt es in stärkerem Maße zu Lichtbrechung und Absorption an den Zell-

innenwänden als bei den üblichen 10 mal 10 mm Küvetten der herkömmlichen Spektralphotometer. Daraus resultiert eine geringfügig (bis zu 2 %) größere, effektive Weglänge des Lichts und ein größerer, vom RI des Fm unabhängiger Reflexionsverlust. Dies erklärt, warum auch UV-durchlässige Komponenten angezeigt werden, z.B. das als Probenlösemittel verwendete Heptan (k' = 0) in dem Fm Petroläther 50/70°, oder warum bei Fm-Gradienten trotz gleicher UV-Durchlässigkeit der Fm-Komponenten die Grundlinie wegläuft, wenn die RI derselben sehr unterschiedlich sind.

Ein weiterer Unterschied der LC-Detektoren zu den herkömmlichen Spektralphotometern besteht in der größeren spektralen Bandbreite, wodurch eine größere Lichtausbeute und damit ein günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wird. Die Halbwertsbandbreiten der LC-Detektoren liegen zwischen 5 und 10 nm, während die molaren Extinktionskoeffizienten bei Halbwertsbandbreiten < 1 nm ermittelt werden. Es sind daher bei LC-Detektoren, besonders für Substanzen mit steilen Absorptionsflanken geringere Linearitäten bzw. kleinere ε-Werte zu erwarten, z.B. für Benzol ε = 100 bei 254 nm und 10 nm Bandbreite gegenüber ε = 215 bei 255 nm[36]. Die Fehler durch Nichtlinearität infolge der größeren Bandbreite bleiben jedoch vernachlässigbar bei E < 0,1 und bis E = 1,0, wenn - nach einer Faustregel - die Bandbreite kleiner als das 0,1-fache der Breite der Absorptionsbande in halber Höhe ist[158].

Abb. 4-25 zeigt die Absorptionskurven von Pulegon und Piperiton für dieselben Lösungen (in Heptan), die mit einem registrierenden Spektralphotometer (Beckmann DBGT) und mit dem verwendeten LC-Detektor (Schoeffel SF 770; 5 nm Halbwertsbandbreite) erhalten wurden. Die Peakbreiten der Absorptionskurven, die als Maß für den Einfluß der spektralen Bandbreite verwendet werden können, sind für beide Spektralphotometer ähnlich, so daß Linearitätsabweichungen infolge des weniger monochromatischen Lichts des LC-Detektors für die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen vernachlässigt werden können. Die Absorptionsmaxima

unterscheiden sich jeweils um etwa 2 nm. Die Abweichungen in der Peakhöhe und in den Absorptionen bei Wellenlängen < 225 nm können auch anders erklärt werden (Skaleneinteilung des LC-Schreibers ≠ E-Einheiten, unterschiedlicher Streulichtanteil der beiden Detektoren u.a.).

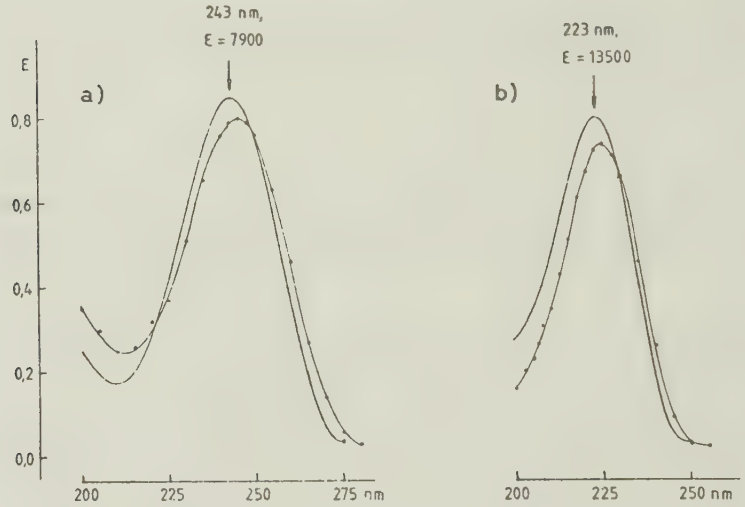


Abb. 4-25: UV-Absorptionskurven von a) Pulegon (98,1 %, 80,5 mg in 5000 ml Heptan) und b) Piperiton (99,5 %, 43,o mg in 5000 ml Heptan) mit dem Spektralphotometer Beckman DBGT (————) und mit dem Schoeffel UV-Detektor SF 770 (–•–•–•–) Heptan als Vergleich.

Allgemein wird man bei quantitativen photometrischen Bestimmungen versuchen, die Extinktion im Absorptionsmaximum zu messen. Bei der LC-Detektion kann es jedoch häufig notwendig sein, an den Absorptionsflanken zu arbeiten, z.B.,

- wenn die zu bestimmenden Verbindungen, wie auch die α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen, nicht bei gleicher Wellenlänge absorbieren, aber in einer einzigen Trennung mit unveränderter Detektoreinstellung erfaßt werden sollen, oder

- wenn nicht interessierende Komponenten des Analysengemisches, die im Maximum der zu bestimmenden Verbindungen noch teilweise UV-absorbieren, bei längeren Wellenlängen unterdrückt werden können, wie z.B. die ungesättigten Alkohole, die auf Kieselgel zwar gut abtrennbar sind, aber erst spät eluiert werden und dadurch die Analysenzeit vergrößern würden, oder
- wenn durch den "cut-off" des Fm der betreffende Teil der Absorptionskurve mehr oder weniger scharf abgeschnitten wird, wie dies Abb. 4-26 besonders deutlich an der Absorption des Piperitons in Chloroform zeigt ("künstliches Maximum"[49]).

Das Arbeiten an Absorptionsflanken bedingt, je nach Steilheit derselben, eine geringere Linearität der Detektoranzeige. Außerdem gewinnt die Wiederholbarkeit der Wellenlängeneinstellung an Gewicht, d.h., es können nach Neueinstellung der Bedingungen unterschiedliche relative Detektorempfindlichkeiten gefunden werden.

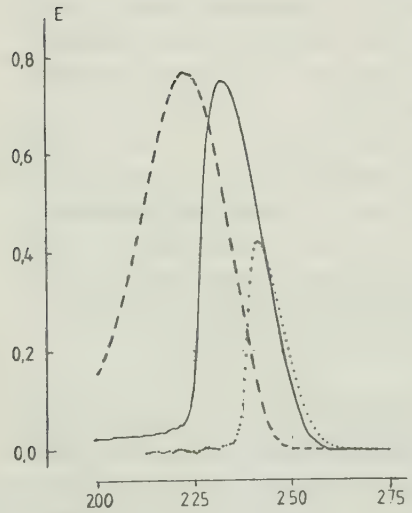


Abb. 4-26

UV-Absorptionskurven von Piperiton (43 mg in 5000 ml)
----- in Heptan
——— in Dichlormethan
····· in Chloroform
(das jeweilige Lösemittel in der Vergleichsküvette)

RI-Detektion[38,158)]

Die quantitative Analyse binärer Gemische mit konventionellen Refraktometern erfolgt fast stets mittels Eichkurven. Nur in seltenen Fällen werden Geraden gefunden, wenn man den RI gegen den Molenbruch oder gegen Volumenprozente aufträgt. Für sehr verdünnte Lösungen, wie sie im Säuleneluat (< 0,1 %) vorliegen, kann Linearität zwischen Konzentration und RI angenommen werden[161)].

Die empfindlicheren RI-Detektoren der LC, die noch RI-Differenzen in der 7. Stelle nach dem Komma anzeigen, messen meist gegen das blanke Fm in der Referenz-Zelle. Es können deshalb je nach Größe des RI des Fm, positive und negative Peaks in einem Chromatogramm erhalten werden. Da der verwendete Integrator nur positive Signale verarbeiten kann, sollte der Ri des Fm dem RI der Probensubstanzen möglichst unähnlich sein.

Die größten RI-Unterschiede zwischen Fm und ätherischen Öl-Inhaltsstoffen dürften mit wenig lichtbrechenden Wasser-Methanol-Gemischen erreichbar sein. Diese sind außerdem leichter thermostatisierbar als lipophile Fm und ihr RI wird weniger durch die Temperatur beeinflußt.

Der RI des Säuleneluats ist u.a. abhängig von der Durchflußrate, vom Druck (ca. $5 \cdot 10^{-5}$/bar[104)]) und in besonders starkem Maße von der Temperatur (bei organischen Flüssigkeiten meist $4 \cdot 10^{-4}$/° C[161)]); das bedeutet, daß die Temperatur z.B. besser als $\pm$ 0,001° C konstant sein muß, wenn man auf 10^{-7} RI-Einheiten genau messen will.

Um festzustellen, inwieweit die n_D^{20}-Werte der reinen Inhaltsstoffe Anhaltspunkte für die relative Detektoranzeige nach der chromatographischen Trennung liefern können, wurde folgender Versuch durchgeführt. Zuerst wurden für eine Reihe von Ver-

gleichssubstanzen die n_D^{20}-Werte ermittelt*). Dieselben Substanzen wurden zu 0,4 % (G/V) in Heptan und Methanol gelöst und mittels statischer Messung die relative RI-Anzeige des LC-Detektors ermittelt**). Abb. 4-27 zeigt die mit dem Abbe-Refraktometer erhaltenen n_D^{20}-Werte der unverdünnten Vergleichssubstanzen (v.l.n.r. der Größe nach geordnet) und darüber die relative Anzeige des LC-Detektors (Fresnel-Typ) für die Lösungen in Heptan und Methanol. Wie erwartet werden die Stoffe in Methanol aufgrund des kleineren RI (n_D^{20} = 1,3287) um einen etwa konstanten Betrag empfindlicher angezeigt als in Heptan (n_D^{20} = 1,3884). Auch wenn sich während der RI-Messungen der verdünnten Lösungen die Temperatur langsam veränderte (die Lösungen wurden daher nach steigenden n_D^{20}-Werten der reinen Stoffe vermessen), so läßt sich doch erkennen, daß die relativen Detektorempfindlichkeiten der gelösten Substanzen vom Lm abhängig sind und nicht mit den Differenzen (Substanz minus Fm) der n_D^{20}-Werte übereinstimmen müssen. Die relativen Abweichungen können bei ähnlich brechenden Reinsubstanzen nach dem Lösen 10 % betragen, obwohl z.B. bei den Monoterpenen der relative Anteil an Heteroatomen oder an Doppelbindungen am Gesamtmolekül nicht sehr groß ist. Berücksichtigt man ferner, daß, wie bei dem Fm Petroläther-Methanol beobachtet (s. 4.3.3.7), der RI einer eluierten Zone noch weit mehr durch Solvatation oder andere Effekte beeinflußt werden kann***), so darf die Auswertung eines RI-Chromatogramms mit der 100-%-Methode ohne Korrekturfaktoren nur bei sehr ähnlichen Substanzen (gleiche funktionelle Gruppen, ähnliche Atom-

---

*) Literaturwerte schienen ungeeignet, da nicht alle der verwendeten Vergleichssubstanzen ausreichend rein waren, und d die bei gleichen Bedingungen ermittelten RI-Werte besser untereinander vergleichbar sind als Literaturwerte aus verschiedenen Quellen.

**) Derartig hohe Konzentrationen kommen in der LC zwar nur bei starker Überladung der Säule vor, doch erschienen sie zweckmäßig, um Meßfehler durch Temperaturschwankungen möglichst klein zu halten.

***) Auf den Vergleich mit den relativen Detektorempfindlichkeiten nach chromatographischer Trennung wurde verzichtet, da hierfür reinere Vergleichssubstanzen notwendig gewesen wären. Außerdem sind die k'-Werte dieser Substanzen auf Kieselgel zu unterschiedlich, so daß mit verschiedenen Fm-Stärken hätte gearbeitet werden müssen.

refraktionen), wie z.B. bei der Trennung von Polymeren, erlaubt sein, - vorausgesetzt natürlich, daß alle Komponenten des Probengemisches bei k'-Werten eluiert werden, bei denen sie sicher durch RI detektierbar sind.

Abb. 4-27: n_D^{20} -Werte der unverdünnten Vergleichssubstanzen mit einem Abbé Refraktometer (++++) und RI-Werte der in Heptan (o-o-o) und in Methanol (●-●-●) zu je 0,4 % (G/V) gelösten Vergleichssubstanzen mit dem LDC-Refraktomonitor.

Im Vergleich mit dem FID der GC ist der RI für die Terpen-Inhaltsstoffe der spezifischere Detektor, auch wenn er zu den unspezifischen Detektoren der LC und der FID zu den spezifischeren Detektoren der GC gerechnet wird.

Weiter zeigte sich bei dem obigen Versuch, daß die Streuung der Meßwerte ohne Flüssigthermostatisierung des RI-Wärmeaustauschers geringer war. Zuerst war mit einer Wasserbadtemperatur von 20° C bei einer Proben- bzw. Raumtemperatur von 22° C gearbeitet worden. Da für jede neue Messung 0,5 bis 1,0 ml der

nächsten Probenlösung in die Detektorzelle gefüllt wurden, entstand eine Temperaturdifferenz zwischen Probenzelle und Vergleichszelle, die sich teilweise in einer stark rauschenden und nicht wiederholbaren Detektoranzeige äußerte. Bei den anschließend durchgeführten Messungen ohne Thermostatisierung (Proben-, Raum- und Detektortemperatur sind gleich) wurde lediglich eine geringe Drift der Werte beobachtet, die vor allem auf eine Änderung des Leerwertes (= Lm in Proben- und Referenzzelle) und weniger auf einen geänderten RI der Probenlösung zurückgeführt werden konnte.

Für die Detektion des Säuleneluats bedeutet dies,

- daß - in engen Grenzen - eine Änderung der Temperatur in erster Linie eine Änderung der Detektor-Null und damit der Chromatogramm-Grundlinie bewirkt,
- daß die Thermostatisierung des RI-Wärmeaustauschers des verwendeten RI-Detektors bei Temperaturen um 20° C mit dem vorhandenen Wasserbad (Haake Thermostat FS; $\pm$ 0,005° C bei 70° C) kaum vorteilhaft ist, wenn die Temperatur nicht genau auf die meist unbekannte Temperatur des Säuleneluats eingestellt werden kann.

Ergänzend zu den bei der Beladbarkeit der Säulen (4.3.4.6) genannten Nachteilen der RI-Detektion und der Schwierigkeit eine befriedigende Chromatogramm-Grundlinie zu erhalten (meist wurde diese erst nach einigen Betriebsstunden gefunden) sei noch erwähnt,

- daß häufig, auch bei Verwendung Fm-schwacher Probenlösemittel, erst nach 3 V_m die Grundlinie wieder erreicht wird, d.h., daß die k'-Werte der zu bestimmenden Substanzen größer 2 sein sollten,
- daß die beobachteten negativen Ausschläge nach dem Lm-Peak oder nach schmalen und hohen Substanzpeaks keine automatische Flächenauswertung mit dem vorhandenen Integrator zulassen, da dieser entweder eine zu tiefe Basislinie annehmen oder das Peakende zu spät erkennen würde,

- daß besonders für quantitatives Arbeiten die Prismenoberfläche der Detektorzelle frei von Ablagerungen sein muß, d.h., häufigeres Reinigen als beispielsweise bei UV-Zellen.

RI-Detektion ist also zumindest für quantitative Bestimmungen kein sehr bequemes Verfahren. Dies ändert jedoch nichts daran, daß unspezifische Detektoren ein geeignetes Mittel sind, um z.B. die Einstellung des Gleichgewichts auf der Säule zu verfolgen, oder um Unregelmäßigkeiten des Trennsystems, wie etwa beim Fm Petroläther-Methanol, auf die Spur zu kommen.

4.3.4.8 Auswertung der Peakhöhen oder Peakflächen[33,39,140,148)]

Während in der GC mit ihren meist massenspezifischen Detektoren allgemein der Auswertung der Peakflächen der Vorzug gegeben wird, kann in der LC in Abhängigkeit von der apparativen Ausrüstung, dem Personal oder dem Trennproblem die Peakhöhenauswertung vorteilhafter sein. Bei den konzentrationsspezifischen Detektoren der LC beeinflussen Ungenauigkeiten der Durchflußrate direkt die Präzision der Peakflächen, nicht aber der Peakhöhen. Für eine genaue Peakhöhenauswertung sind dagegen konstante Peakbreiten und konstante k'-Werte Voraussetzung, d.h., die Peakhöhe wird durch die Genauigkeit der Probenaufgabe - besonders bei den früh eluierten Komponenten - durch die Aktivität der stationären Phase, durch die Fm-Zusammensetzung und durch die Säulentemperatur beeinflußt (s.a. 4.3.4.2 und 4.3.4.4). Bei guter Konstanz der Trennbedingungen und guter Wiederholbarkeit der Probenaufgabe (z.B. durch Schleifen) aber bei schlecht kontrollierbarer Durchflußrate ist daher die Peakhöhenauswertung vorzuziehen.

Die Auswertung der Peakhöhen liefert außerdem richtigere und genauere Ergebnisse: a) bei kleinem Signal-Rausch-Verhältnis, das die elektronische Flächenauswertung stört, und das in der LC mit ihren unempfindlicheren Detektoren häufiger beobachtet wird als in der GC, und b) bei nicht vollständig aufgelösten

Peaks, wobei in der LC infolge ungleicher Säulenpackung häufiger unsymmetrische Peaks gefunden werden als in der GC, so daß bei Peakflächenauswertung Fehler entstehen, die sehr viel größer sind als jene, die für symmetrische Peaks aus der relativen Peakgröße und aus der Auflösung berechnet werden können[33] (s.a. 4.3.4.2 Verhältnis Neral : Geranial).

Die Auswertung der Peakhöhen ergibt ungenaue oder falsche Werte bei nichtlinearer Detektoranzeige oder wenn mit überladenen Säulen gearbeitet wird, sei es wegen der geringen Empfindlichkeit des Detektors (z.B. RI) oder weil Spurenkomponenten neben großen Konzentrationen an Hauptkomponenten nachgewiesen werden sollen. Auch kann es bei den ätherischen Ölen vorkommen, daß die Substanzzone einer gut UV-absorbierenden Komponente durch eine nachfolgende, nicht UV-absorbierende Hauptkomponente zusammengeschoben wird, ohne daß dies bemerkt wird. (In der DC war dergleichen bei Menthaöl für Piperiton und Menthol beobachtet worden.)

In Tab. 4-13 waren für maximales Probenvolumen (5 µl) und für völlig getrennte Peaks über einen relativ kurzen Zeitraum (etwa 40 min für 10 - 12 Trennungen) etwa gleiche Streuungen für die Peakhöhen und Peakflächen ebenso wie für die vom Dosierfehler unabhängigen, relativen Peakhöhen und Peakflächen gefunden worden.

Bei den folgenden quantitativen Bestimmungen wurde - bei ausreichend aufgelösten Peaks und guter Basislinie - die Peakflächenmethode verwendet;

- da bei den verwendeten kurzen Säulen die Peakform der früh eluierten Komponenten durch die Art der Spritzenentleerung beeinflußt werden könnte,
- da die Aktivität des Kieselgels bei den verwendeten unpolaren Fm relativ schwer einzustellen und über lange Zeiträume nicht sehr genau konstant zu halten ist. (Die Peakhöhenmethode wäre dennoch einsetzbar, wenn bei interner Standardisierung das Verhältnis der Peakhöhen der zu bestimmenden Stoffe nicht durch Änderungen der stationären Phase beeinflußt

wird, also die Selektivität gleich bleibt.)
- da die Temperatur eventuell nicht genau genug zu kontrollieren ist.

4.3.4.9 Umwandlung der Meßwerte in das Analysenergebnis

Von den 4 Auswertemethoden (100-%-Methode, Zumischmethode, interne und externe Standardisierung), die bereits in der GC (3.3.6 und 3.4.1) diskutiert wurden, dürfte in der LC die interne Standardisierung[162] besonders vorteilhaft sein,
- da zahlreiche Fehlerquellen (Probendosierung, Nichtkonstanz der Fm-Förderung, Temperaturschwankungen, Detektoreigenschaften u.a.) so am besten vermieden werden können und damit gleichzeitig die Ansprüche an die apparative Ausrüstung und somit die Kosten klein gehalten werden können,
- da durch die besseren Möglichkeiten, die Selektivität der Trennung zu beeinflussen, und durch die spezifischen Detektoren es eher als in der GC möglich ist - auch bei so komplexen Gemischen -, im Chromatogramm einen geeigneten Platz für den internen Standard zu finden.

Für die externe Standardisierung wäre die bei 5 µl Probenvolumen gefundene Präzision ($s_{rel} \pm 1$ %) zwar ausreichend, doch müßten, um Ausreißerwerte zu erkennen, mehrere Werte je Probe (z.B. n = 3) ermittelt werden, was bei fehlender automatischer Dosiervorrichtung einen größeren Zeit- und Arbeitsaufwand bedeutet.

Gegen die Zumischmethode spricht, daß für eine gute Genauigkeit wegen der geringen Linearität der LC-Detektoren nur ähnlich große Peaks verglichen werden sollten (s.a. 4.3.4.2).

Die 100-%-Methode (ohne Korrekturfaktoren) läßt sich bei den nichtderivatisierten ätherischen Öl-Inhaltsstoffen wegen der sehr verschiedenen k'-Werte und der - auch bei RI-Detektion - unterschiedlichen relativen Detektorempfindlichkeiten nicht verwenden (s.a. 4.3.4.7).

4.3.5 Quantitative HPLC-Bestimmungen

Bei den im vorhergehenden Abschnitt (4.3.4 Faktoren, die die quantitative Analyse beeinflussen) durchgeführten Untersuchungen zeigte die Probendosierung den größten Einfluß auf die Streuung der Werte. Die Messungen erstreckten sich meist nur über wenige Stunden; bei Bestimmungen über einen längeren Zeitraum ist mit einer Drift der Werte zu rechnen, wenn die Fm-Stärke, der Belegungsgrad der stationären Phase oder die Temperaturen nicht sehr gut konstant gehalten werden können. Durch interne Standardisierung lassen sich beide Fehler klein halten.

Im Gegensatz zu den obigen Untersuchungen (4.3.4), die mit Gemischen aus wenigen reinen Vergleichssubstanzen durchgeführt wurden, werden für die folgenden Bestimmungen ätherische Öle oder deren Gemische verwendet. Dabei können Trennungen mit gestörter Grundlinie und schlechter zu integrierenden Peaks erhalten werden, d.h., neben den oben diskutierten Fehlern ist mit weiteren unsystematischen wie systematischen Fehlern zu rechnen.

4.3.5.1 Bestimmung der ätherischen Öle im Gemisch anhand der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen mittels UV-Detektion

Von den oben untersuchten Trennsystemen ist für die Bestimmung der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen das System Petroläther-Dioxan, 99 + 1,/Kieselgel wegen seiner guten Selektivität und seiner hohen Beladbarkeit am besten geeignet. 1200 Trennstufen genügen zur Grundlinientrennung (R_s = 1,5), der reinen UV-absorbierenden C = O-Verbindungen (4.3.3.6).

a) Gehalt der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen in den einzelnen Ölen

Abb. 4-28a)-d) zeigt die Chromatogramme der 4 ätherischen Öle bei 230 nm (s.a. Abb. 4-19). Für die gut abgetrennten und spezifisch zu detektierenden Carbonylverbindungen wurden durch Vergleich der entsprechenden Peakflächen im ätherischen Öl mit den Peakflächen der gereinigten Vergleichsstoffe (externe Standardisierung, n = 3) bei 230 und 245 nm folgende Gehalte ermittelt (s.a. halbquantitative DC-Auswertung: Tab. 4-4):

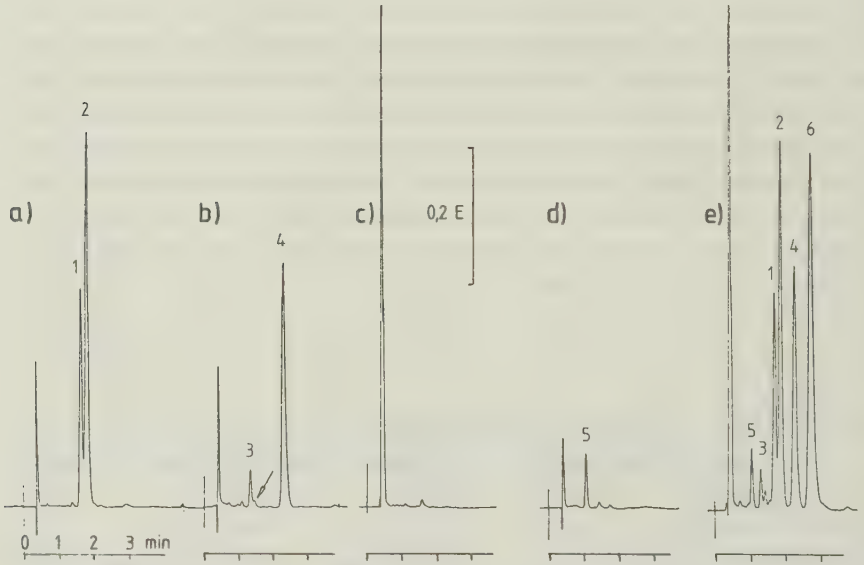


Abb. 4-28: Trennungen von a) Melissenöl, b) Menthaöl, c) Pinusöl, d) Eucalyptusöl und e) einer Mischung der vier Öle (zu gleichen Teilen) + interner Standard (Phthalsäuredibutylester);
Probenvolumen: je 5 µl; Konzentration der Öle: 0,8 %, des int. Standards: 0,16 % in Heptan; LiChrosorb SI 60, 5 µm, 15 cm . 0,3 cm; Petroläther-Dioxan, 99 + 1 (V/V), wassergesättigt durch Vorsäule wie in Abb. 4-17 a; 2 ml/min, 58 bar, N = 2700 für Piperiton; UV 230 nm, 1,0 E;

1 = Neral, 2 = Geranial, 3 = Pulegon, 4 = Piperiton, 5 = Pinocarvon, 6 = Phthalsäuredibutylester.

5,6 % Citral im Melissenöl,
0,7 % Pulegon und
3,1 % Piperiton im Menthaöl,
etwa 0,5 % Pinocarvon im Eucalyptusöl.

Pinocarvon konnte nicht genau bestimmt werden, da sich die synthetisierte Vergleichssubstanz rasch durch Polymerisation veränderte und noch Myrtenal als Verunreinigung enthielt, welches in diesem System nicht ausreichend abzutrennen ist. Auch müßte bei gleichzeitiger Anwesenheit von Pinocarvon und Myrtenal im Eucalyptusöl[1)] ein anderes Fm verwendet werden, z.B. Petroläther-Methanol, 100 + 0,125 (Tab. 4-11). Eine Gesamtbestimmung beider Carbonylverbindungen ist ebenfalls nicht möglich, da jene unterschiedliche UV-Absorptionen besitzen (Tab. 2-1).

Keine Fehler hingegen entstehen aus der unvollständigen Auflösung der beiden Citral-Isomere, da das Verhältnis Neral : Geranial im Melissenöl und im Citral-Vergleich (37 : 63) praktisch gleich ist und da sich die beiden Isomere nur geringfügig in ihrer UV-Absorption unterscheiden (Tab. 2-1).

Die Bestimmung des Pulegons wird durch die bei 230 nm in Abb. 4-28b sichtbare Rückschulter praktisch nicht gestört. Sie konnte getrennt integriert werden; auch wurde bei 245 nm, einer Wellenlänge, bei der jene sehr viel weniger angezeigt wird, kein geringerer Pulegongehalt gefunden.

b) Wahl des internen Standards

Abb. 4-28a)-d) zeigt, daß bei 230 nm in den 4 ätherischen Ölen neben den α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen nur wenige größere Peaks vorliegen, daß also vor dem zuerst eluierten Pinocarvon wie auch nach dem zuletzt erscheinenden Piperiton genügend Raum für einen internen Standard ist.

Die Anforderungen an den internen Standard sind in der LC geringer als in der GC. Eine LC-interne-Standard-Substanz sollte neben der ausreichenden Auflösung (R_s > 1,25 bei Peakflächenauswertung) folgende Eigenschaften besitzen:

- Sie sollte leicht in reiner Form zugänglich, nicht zu flüchtig, chemisch stabil sein und nicht mit anderen Probenbestandteilen, der Säulenfüllung oder der mobilen Phase reagieren.
- Sie sollte gut in der mobilen Phase löslich sein, ähnliche Massentransportgeschwindigkeiten aufweisen, eine ähnliche Molekülgröße besitzen (um bei kleinen Porendurchmessern einen teilweisen Ausschluß zu vermeiden) und, falls die Trennbedingungen nicht genau genug konstant zu halten sind, ihren k'-Wert ähnlich ändern wie die zu bestimmenden Probenbestandteile.
- Sie sollte ähnlich gut detektierbar sein und eine vergleichbare Linearität der Detektoranzeige aufweisen, d.h. z.B. ähnlich breite UV-Absorptionsbanden und genügend große ε-Werte.

Es erschien unwahrscheinlich - abgesehen von den Schwierigkeiten, genügend reine Terpen-Vergleichssubstanzen zu erhalten-, ein α,β-ungesättigtes Terpenketon oder -aldehyd mit entsprechender UV-Absorption zu finden, das auf Kieselgel knapp vor Pinocarvon oder nach Piperiton eluiert wird. Daher wurden andere, leichter erhältliche Substanzen (auch mit anderen funktionellen Gruppen) auf ihre Eignung als interner Standard geprüft. Tab. 4-14 gibt die k'-Werte von einigen getesteten Substanzen und die gleichzeitig gefunden k'-Werte der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen wieder. Sowohl die Benzoesäureester, die zwischen den Terpenestern und Pinocarvon eluiert werden (s.a. Tab. 4-9), als auch Anisaldehyd und die Phthalsäureester, die nach dem Piperiton die Säule verlassen, werden ausreichend abgetrennt.

Tabelle 4-14: k'-Werte der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen und einiger Vergleichssubstanzen, die auf ihre Eignung als interne Standards untersucht wurden. (Trennsystem wie in Abb. 4-28)

Benzoesäureäthylester	1,13	
Benzoesäuremethylester	1,30	
Benzaldehyd	1,80	α = 1,38, d.h. für R_s = 1,5:
Pinocarvon	1,80	N_{eff} = 475 bzw. $\bar{N}$ = 1150
Benzophenon	2,20	
Pulegon	2,50	
Acetophenon	2,80	
Menadion	3,50	
Neral	3,50	
Geranial	4,30	
Piperiton	5,10	
Anisaldehyd	6,10	α = 1,22, d.h. für R_s = 1,5:
Phthalsäuredibutylester	6,20	N_{eff} = 1100 bzw. $\bar{N}$ = 1500
Phthalsäurediäthylester	9,50	
1,3-Dinitrobenzol	12,10	

Abb. 4-29 zeigt die Absorptionskurven von Anisaldehyd und Phthalsäuredibutylester im Vergleich zu den UV-Maxima von Piperiton, Citral und Pulegon in Heptan*). Die UV-Kurven der Benzoesäureester und des Phthalsäurediäthylesters wurden nicht abgebildet, da sie sich in ihren λ_{max}- und ε-Werten nur unwesentlich von Phthalsäuredibutylester unterscheiden[47]. Anisaldehyd (= p-Methoxybenzaldehyd) zeigt bei den interessierenden Wellenlängen (220 - 245 nm) ein Absorptionsminimum und eine relativ steile Peakflanke. (o- und m-Methoxybenzaldehyd, die bei 245 nm eine maximale Absorption aufweisen, standen nicht zur Verfügung). Phthalsäuredibutylester dagegen zeigt seine maximale Absorption bei etwa derselben Wellenlänge wie Piperiton und besitzt ähnlich steile Absorptionsflanken wie die Carbonylverbindungen. Phthalsäureester erscheinen daher ebenso wie Benzoesäureester als interne Standards geeignet; d.h. auch, daß Analysen mit zwei internen Standards - je einem vor bzw. nach den α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen - unschwer zu verwirklichen wären.

---

*) Nicht verschieden von der Absorption in dem Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1. Die Breite der Absorptionsmaxima ist ähnlich wie in Abb. 4-11 (in Methanol).

Bei den folgenden Bestimmungen wurde mit Phthalsäuredibutylester als interem Standard gearbeitet, da dieser in reinster Form (99,5 %) vorhanden war (Abb. 28e).

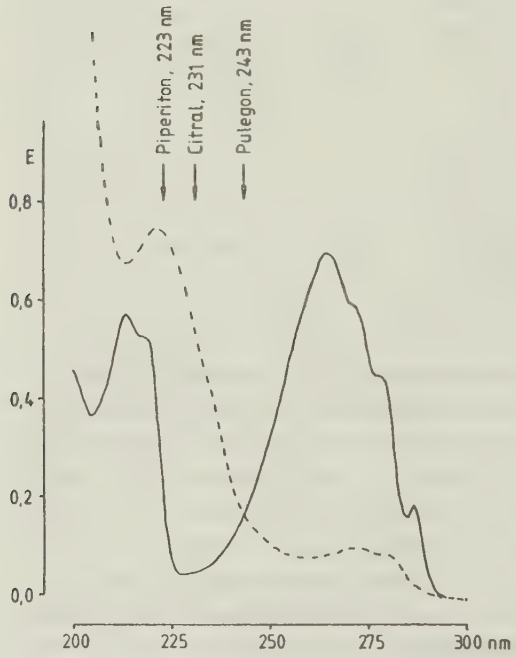


Abb. 4-29:
UV-Absorption (in Heptan) von (———) Anisaldehyd ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg ml^{-1}, $\lg\varepsilon = 4{,}27$ bei 265 nm) und von (....) Phthalsäuredibutylester ($1{,}15 \cdot 10^{-2}$ mg ml^{-1}, $\lg\varepsilon = 3{,}95$ bei 221 nm)

c) Bestimmung von Melissenöl, Menthaöl und Eucalyptusöl im Gemisch der 4 Öle

Um die Richtigkeit und Genauigkeit der Bestimmung der einzelnen Öle im Gemisch aller Öle anhand der UV-absorbierenden C = O-Verbindungen aufzuzeigen, wurden die Peakflächenverhältnisse von Pinocarvon, Pulegon, Citral und Piperiton zu Phthalsäuredibutylester im Einzelöl und im Gemisch der Öle miteinander verglichen.

Die Probenlösungen der einzelnen Öle wie auch des Gemisches aus allen 4 Ölen wurden durch Verdünnen desselben Volumens der gleichen Stammlösungen hergestellt, so daß neben Integrationsfehlern nur die Volumenfehler der Vollpipetten (2,00 und 5,00 ml) und der Meßkolben (25,00 ml) in das Endergebnis eingehen. Bei der Wahl der Probenkonzentration wurde darauf geachtet, daß die maximale Extinktion der Peaks < 1 ist, weil bei der zur Detektion verwendeten Wellenlänge von 230 nm (= 228 nm an dem für die Abb. 4-29 benutzten Spektralphototmeter Beckman DBGT) die Extinktion einiger Probenkomponenten an deren Absorptionsflanken gemessen wird, d.h. daß bei größeren Peaks mit nichtlinearer Detektoranzeige zu rechnen wäre (4.3.4.7). Die Detektorempfindlichkeiten von Pulegon, Citral, Piperiton und Phthalsäuredibutylester verhalten sich bei 230 nm wie 1,24 : 3,45 : 3,17 : 1,00.

Abb. 4-28e zeigt ein Chromatogramm des Gemisches der vier Öle mit internem Standard. Bei dieser Trennung beträgt die Probenmenge 0,16 mg, entsprechend einem Verhältnis zur Säulenfüllung von 1 : 3000; es ist daher nicht mit Überladung der stationären Phase zu rechnen (4.3.4.6), zumal sehr viele Komponenten bei k' < 1 eluiert werden und die Probenkonzentrationen für die Einzelkomponenten mehr als 5 mal kleiner sind. Die Peakfläche des internen Standards ist beträchtlich größer als die des Piperitons und der einzelnen Citral-Isomere; dies hat jedoch den Vorteil, daß der relative Fehler durch Überlagerung dieses Peaks mit kleineren Peaks der ätherischen Öle geringer wird (Abb. 4-28).

Tab. 4-15 gibt die Quotienten $\frac{\text{Fläche der C = O-Verbindung}}{\text{Fläche des int. Standards}}$ und die Wiederfindungsraten von Pinocarvon, Pulegon, Citral und Piperiton im Gemisch der 4 Öle wieder. Es zeigt sich, daß die unvollständig abgetrennten, kleineren Peaks der einzelnen Öle die Integration der zu bestimmenden Komponenten im Gemisch der Öle erheblich stören. Die Wiederfingungsraten weisen - in Abhängigkeit von der Peakauflösung und der relativen Peakgröße - z.T. große systematische Fehler auf. Noch einigermaßen

richtig im Gemisch der 4 Öle ist die Integration des Piperitons, der Fehler der ähnlich hohen, aber weniger vollständig von kleinen Peaks abgetrennten Citralpeaks beträgt + 2,7 %, relativ; die Werte für die kleineren, unvollständig aufgelösten Peaks des Pinocarvons und des Pulegons sind mit relativen Fehlern von +5 bis +15 % nicht mehr brauchbar.

Tabelle 4-15: Quotienten $\frac{F\ (C = O\text{-Verbindung})}{F\ (int.\ Standard)}$ und Wiederfindungsraten der Carbonylverbindungen im Gemisch der vier Öle (in %; mittlerer Gehalt (n = 2) im Einzelöl = 100 %)

	Melissenöl	Menthaöl	Eucalyptusöl	Melissenöl, Menthaöl, Pinusöl, Eucalyptusöl zu etwa gleichen Teilen
Pinocarvon			0,0613 = 100,4 % 0,0608 = 99,6 %	0,0656 = 107,5 % - -
Pulegon		0,0439 = 97,7 % 0,0460 = 102,3 %		0,0490 = 109,0 % 0,0513 = 114,1 %
Citral	0,9628 = 99,8 % 0,9660 = 100,2 %			0,9917 = 102,8 % 0,9903 = 102,7 %
Piperiton		0,5083 = 100,1 % 0,5071 = 99,9 %		0,5121 = 101,9 % 0,4994 = 99,4 %

Auch die Streuung der Werte (n = 2) ist infolge unvollständiger Peakauflösung und erschwerter Peakerkennung durch den Integrator teilweise größer als die Streuung der Probendosierung (s_{rel} = $\pm$ 0,7 %, n = 12; s. 4.3.4.2) oder als die Streuung der Flächen des internen Standards (s_{rel} = $\pm$ 1,3 %, n = 8). Angesichts der Schwierigkeiten einer genauen elektronischen Flächenbestimmung dürften daher auch mit externer Standardisierung hinreichend genaue und u.U. richtigere Ergebnisse erhalten werden, zumal der Zeitbedarf z.B. für drei Bestimmungen je Probe (3 x 4 min) annehmbar ist.

Bessere Analysenergebnisse sind nach Vergrößerung der Trennstufenzahl durch längere Säulen zu erwarten. Auch die Detektion bei einer anderen Wellenlänge bietet sich an. Letzteres würde vor allem für Pinocarvon und Pulegon richtigere Ergebnisse bringen, da bei Wellenlängen > 240 nm die störenden kleinen Peaks relativ weniger UV-absorbieren (Abb. 4-30). Außerdem erhöht die Wiederholung einer Bestimmung bei einer anderen Wellenlänge die Zuverlässigkeit eines Ergebnisses.

Auf die Auswertung der Peakhöhen wurde verzichtet, da diese teilweise so klein waren, daß eine genaue Messung nicht möglich gewesen wäre, und da die manuell angelegte Grundlinie in den erhaltenen Chromatogrammen kaum richtiger erschien als die vom elektronischen Integrator erkannte Basislinie.

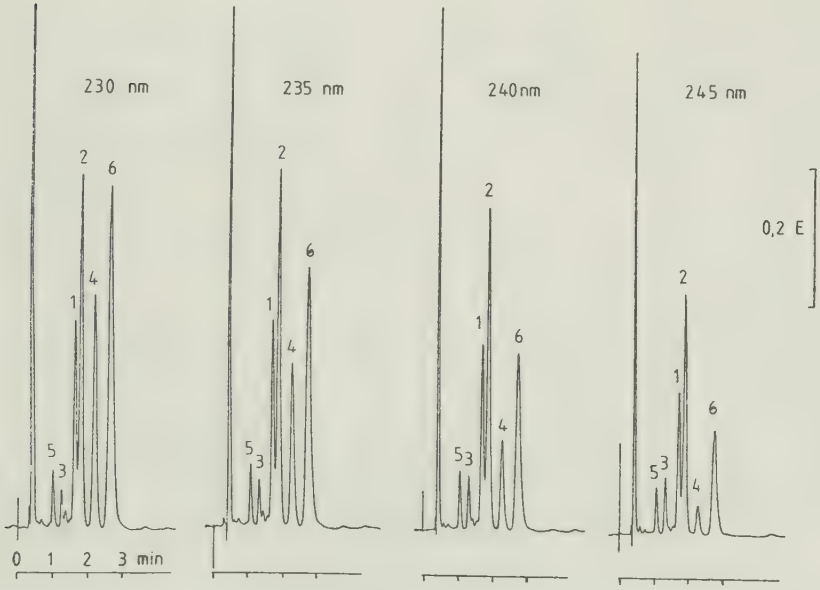


Abb. 4-30: Chromatogramme einer Mischung der vier ätherischen Öle (zu etwa gleichen Teilen) + interner Standard bei 230, 235, 240 und 245 nm; übrige Bedingungen und Peaknummerierung wie in Abb. 4-28 e.

4.3.5.2 Bestimmung von Cineol im Eucalyptusöl mittels RI-Detektion

1,8-Cineol ist als gesättigter cyclischer Äther für eine Bestimmung mit UV-Detektor auch bei Wellenlängen nahe 200 nm ungeeignet. Die folgende Bestimmung möge ein Beispiel für die LC-Bestimmung einer Hauptkomponente mit RI-Detektor sein. Das verwendete System LiChrosorb RP-8/Methanol-Wasser, 50 + 50, besitzt, wie erwähnt, die Vorzüge einer hohen Beladbarkeit (1 : 1000; s. 4.3.4.6) und einer empfindlichen Detektion infolge des sehr geringen RI und der guten Thermostatisierbarkeit des wasserhaltigen Fm (s. 4.3.4.7).

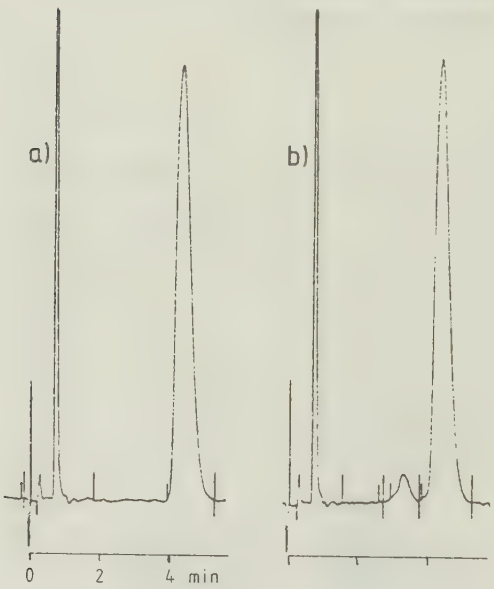


Abb. 4-31:

Bestimmung des Cineols im Eucalyptusöl;
je 5 µl a) einer 3,6 proz. Cineol-Lösung (in Methanol), b) einer 4,6 proz. Eucalyptusöl-Lösung in Methanol;
LiChrosorb RP-8, 10 µm, 25 cm . 0,3 cm i.D., oO° Säulentemperatur;
Wasser-Methanol, 50 + 50 (V/V), 2 ml/min, 110 bar;
RI-Detektion: x8

Abb. 4-31 zeigt je eine Trennung des Eucalyptusöls (s.a. Abb. 4-13b) und einer ähnlich konzentrierten Cineol-Lösung. Das Verhältnis Probenmenge Cineol : Säulenfüllung betrug 1 : 5000, so daß ein Verlust an Trennschärfe durch Überladung der stationären Phase nicht zu befürchten ist (s.a. 4.3.4.6).

Durch externe Standardisierung wurde ein Cineol-Gehalt des Eucalyptusöls von 78,3 % (G/G) gefunden. Die relative Standardabweichung für die Cineolflächen lag bei ± 0,7 % (n = 7) für den externen Standard (Cineol) und bei ± 1,1 % (n = 6) für das Eucalyptusöl. Eine anschließend mit denselben Lösungen durchgeführte GC-Bestimmung ergab bei ähnlich streuenden Werten einen Cineol-Gehalt von 78,5 % (G/G). Die mit den verschiedenen chromatographischen Methoden gefundenen Cineol-Werte stimmen also innerhalb der Genauigkeit der Verfahren überein. Es kann daher angenommen werden, daß bei diesem Eucalyptusöl nur sehr kleine Mengen anderer Eucalyptusöl-Inhaltsstoffe vom Cineol-Peak überlagert und dadurch miterfaßt werden.

Ein Nachteil des RP-Systems ist die unbefriedigende Abtrennung des Cineols von den in a n d e r e n ätherischen Ölen vorkommenden Inhaltsstoffen; Monoterpenalkohole, -aldehyde und -ketone werden bei ähnlichen k'-Werten eluiert (s. Tab. 4-7 und Abb. 4-13b), so daß eine Bestimmung des Eucalyptusöls im Gemisch aller Öle anhand des Cineols nicht möglich ist. Kieselgel, das die sauerstoffhaltigen Terpene besser zu trennen vermag, erwies sich in Verbindung mit dioxanhaltigen Fm für die Bestimmung des Cineols als nicht geeignet,

- da auf Cineol und ähnlich zurückgehaltene Substanzen, z.B. Menthon, stets ein negatives RI-Signal folgte, dessen Größe proportional der Probenmenge war (Abb. 4-32). Cineol wird bei mittlerer Wasserbelegung des LiChrosorbs und bei Dioxangehalten des Fm von 0,1 oder 0,2 % in Petroläther bei k' = 5 bzw. 3 eluiert.
- da die Beladbarkeit und damit die Trennstufenzahl für Substanzen in diesem k'-Bereich sehr viel schlechter war als z.B. für Pulegon oder Piperiton (s. 4.3.4.6).

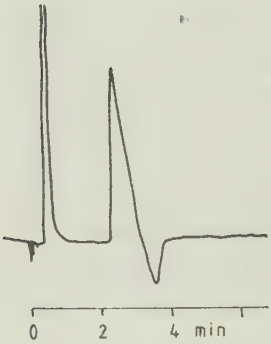


Abb. 4-32: Peakform von 0,2 µl Cineol (zu 4 % in Heptan gelöst)
LiChrosorb SI 60 -Säule und Aktivität wie in Abb. 4-28;
Petroläther 50/70° -Dioxan, 99,9 + 0,1 (V/V), 2 ml/min, 54 bar;
RI-Detektion;
k' von Cineol: 4,9,
Probenmenge : Menge an stationärer Phase = 1:3000
Trennstufenzahl 150 gegenüber >1000 bei Nicht-Überladung

Beide Erscheinungen wurden nach Austausch der polareren Fm-Komponente, Dioxan, durch entsprechend größere Mengen einer weniger polaren Fm-Komponente nicht mehr beobachtet. Erklärt werden kann das anomale Verhalten des Trennsystems damit, daß der stationären Phase durch die Probensubstanz Dioxan entzogen wird, welches in diesem System eine ähnliche Retention aufweist wie der negative RI-Peak des Cineols (Abb. 4-32). In dem nachfolgenden Fm würde dann durch Re-Adsorption von Dioxan durch das Kieselgel eine dioxanärmere, weniger lichtbrechende Zone entstehen. Die schlechte Beladbarkeit für Cineol und ähnlich zurückgehaltene Substanzen könnte durch den relativ geringen Dioxangehalt der mobilen (0,1 bis 0,2 %) und damit auch der stationären Phase erklärt werden.

Abb. 4-33 zeigt die Trennungen der 4 ätherischen Öle auf LiChrosorb SI 60 mit dem Fm Petroläther-Isopropyläther, 98 + 2 (V/V). Bei dieser Fm-Stärke, die etwa der des Fm Petroläther-Dioxan, 99,9 + 0,1 (V/V) entspricht, werden neben Cineol die Terpenester und C = O-Verbindungen bei vernünftigen k'-Werten eluiert (s.a. Abb. 4-1 und Tab. 4-9).

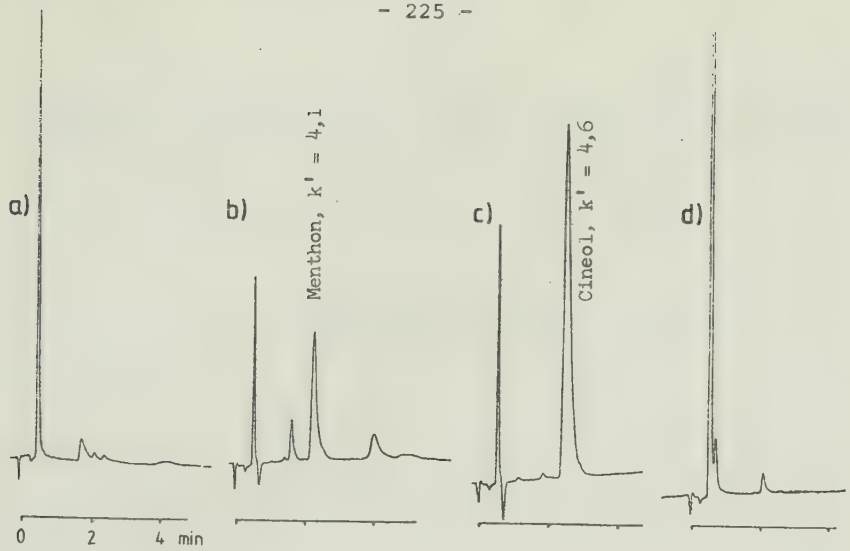


Abb. 4-33: Trennungen der früh eluierten sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe von a) Melissenöl, b) Menthaöl, c) Eucalyptusöl und d) Pinusöl; je 5 µl der 5 proz. Lösungen in Benzin 50/70°; LiChrosorb SI 60 -Säule und Aktivität wie in Abb. 4-28; Petroläther 50/70 - Dioxan, 98 + 2 (V/V), 2 ml/min, 50 bar, RI-Detektion

Eine Bestimmung des Eucalyptusöls im Gemisch der Öle anhand des Cineols ist mit diesem Trennsystem möglich, doch erfordert die Abtrennung von dem in großer Menge vorkommenden Menthon eine hohe Trennstufenzahl (α = 1,12; d.h. bei diesen k'-Werten N = 10500 für R_s = 1,5 bzw. N = 4600 für R_s = 1,0). Infolge der Bandenverbreiterung im Wärmeaustauscher des RI-Detektors sind so hohe Trennstufenzahlen schwerer zu verwirklichen als beispielsweise mit dem UV-Detektor. Für die in Abb. 4-33 verwendete Säule wurden z.B. bei sonst gleichen Trennbedingungen mit dem RI-Detektor N = 1000 (für Cineol, k' = 4,6) und mit dem UV-Detektor N = 2500 (für Nitrobenzol, k' = 1,7) gefunden. Allerdings ist der Beitrag des RI-Wärmeaustauschers zur Bandenverbreiterung bei unveränderter Durchflußrate in etwa konstant, d.h., daß sein relativer Anteil an der Gesamtzonenverbreiterung mit der Breite der Peaks am Säulenende und damit mit der Säulenlänge abnimmt.

Neben den größeren Säulenlängen wird schließlich die Analysenzeit auch durch die später erscheinenden Komponenten besonders des Melissen- und Menthaöls erhöht.

4.3.6 Diskussion der HPLC-Untersuchungen

Die quantitativen HPLC-Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, die ätherischen Öle anhand der α,β-ungesättigten C = O-Verbindungen, soweit solche vorliegen, im Gemisch der Öle zu bestimmen. Die Selektivität des Systems Petroläther-Dioxan/Kieselgel erlaubt eine Grundlinientrennung der reinen Vergleichsstoffe in einer Zeit von 2min. Für die Bestimmung derselben Stoffe im Gemisch aller Öle sind etwas größere Analysenzeiten erforderlich, da in den ätherischen Ölen noch andere Stoffe bei diesen Wellenlängen - wenn auch in geringem Ausmaße - absorbieren. Für die reinen C = O-Verbindungen betrug die Streuung der Peakflächen $\pm$ 0,7 % (s_{rel} bei externer Standardisierung) und der Peakflächenverhältnisse < $\pm$ 0,1 % (s_{rel} bei interner Standardisierung).

Auch anhand der nicht oder wenig UV-absorbierenden Inhaltsstoffe lassen sich die einzelnen Öle im Gemisch der Öle bestimmen, z.B. anhand von Cineol, Menthon, Menthol und Geraniol. Hierfür würde sich die Chromatographie auf Kieselgel eignen. Eine Bestimmung mit RI-Detektion erscheint jedoch u.a. aus folgenden Gründen für Routine-Untersuchungen weniger vorteilhaft.

- Wegen der gegenüber UV-Detektion größeren Zahl an detektierten Komponenten dürften allgemein größere Trennstufenzahlen und größere Analysenzeiten erforderlich sein, zumal der Gebrauch des vorhandenen RI-Detektors mit einer Einbuße an Trennstufen verbunden ist und bei RI-Detektion in der Regel auch die später eluierten Komponenten abgewartet werden müssen.
- Wegen der sehr unterschiedlichen k'-Werte der Hauptkomponenten muß mit Fm verschiedener Stärke gearbeitet werden, um z.B. Cineol, Menthol und Geraniol nebeneinander zu bestimmen.

Gradienten-Elution ist auf Kieselgel aber praktisch ausgeschlossen und ein Fm-Wechsel ist allgemein mit längeren Spül- und Konditionierungszeiten verbunden und sollte in einem vernünftigen Verhältnis zur Probenzahl stehen.

- Wegen der geringen Empfindlichkeit des RI-Detektors muß für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis bei Untersuchungen von Gemischen der 4 Öle nahe der Beladbarkeitsgrenze der stationären Phase gearbeitet werden.
- Schließlich ist bei RI-Detektion die Grundlinie schwerer konstant zu halten.

Die Genauigkeit der Peakflächen war bei RI-Detektion (für vollständig getrennte Peaks) ähnlich groß wie bei UV-Detektion, nicht jedoch die der Peakhöhen, da offenbar die Bandenverbreiterung im Wärmeaustauscher des RI-Detektors schlecht wiederholbar ist. Für RI-Bestimmungen einzelner Komponenten in einem ätherischen Öl wird der RP-Chromatographie - bei entsprechender Selektivität des Trennsystems - der Vorzug gegeben wegen der kleineren RI und der besseren Thermostatisierbarkeit der wäßrigen Fm.

Die quantitativen Ergebnisse sind wie die gemachten qualitativen Aussagen nur beschränkt zu verallgemeinern. Sie sind abhängig von der apparativen Ausrüstung und dem verwendeten Trennsystem. So ist z.B. die Konstanz der k'-Werte und damit der Peakhöhen unter anderem abhängig von der Temperatur und daher unterschiedlich je nach dem Wärmeausdehnungskoeffizient des Fm und der Temperaturempfindlichkeit des Trennsystems. Während mit Kieselgelsäulen und dem Fm Petroläther-Dioxan, 99 + 1, und mit Wassersättigung durch Vorsäulen aber ohne Säulenthermostatisierung wiederholt morgens 5 % größere k'-Werte gefunden wurden als am Abend desselben Tages, waren mit RP-Säulen bei 60° C Säulentemperatur und mit Einpumpenbetrieb die Streuungen der Retentionszeiten sehr viel geringer. Ferner sind die Konditionierungszeiten für jedes Trennsystem verschieden; z.B. wäre auf Kieselgel für polarere Fm ein schnelleres Einstellen der Trennbedingungen zu erwarten, da jene in der Regel eine bessere Wasserlöslichkeit besitzen. Auch Gradientenelution wäre u.U. auf Kieselgel möglich z.B. mit dem Fm Petroläther-Dioxan,

wenn für eine unveränderte Aktivität des Kieselgels der Wassergehalt des Fm dem Dioxangehalt des Fm proportional wäre. Schließlich brauchten die Ansprüche an die UV-Durchlässigkeit der Fm weniger streng zu sein, wenn Verbindungen mit längerwelligen UV-Maxima zu untersuchen wären.

Auf eine Derivatisierung der meist nicht UV-absorbierenden Terpene, um besser und empfindlicher detektierbare Verbindungen zu erhalten, wurde verzichtet,

- da damit ein Vorzug der schonenderen chromatographischen Verfahren verloren gehen würde. (Sehr viele Umsetzungen erfolgen unter aggressiven chemischen Bedingungen und häufig in saurem Milieu, so daß Cyclisierungen und Dehydratisierungen der Terpene wahrscheinlich sind.),
- da angenommen werden kann, daß nicht alle Umsetzungen quantitativ verlaufen, z.B. die Reaktion von Campher oder Menthon mit Dinitrophenylhydrazin,
- da Derivate häufig schlechter chromatographisch zu trennen sind als die Ausgangsprodukte,
- da eine HPLC nach Derivatisierung nur bei speziellen Problemen Vorteile gegenüber der GC bieten würde, die bei den Monoterpenen ohne Derivatisierung auskommt.

5. SCHLUSSDISKUSSION VERGLEICH DER GC- UND HPLC-ERGEBNISSE

Die quantitative Bestimmung ätherischer Öle in Ölgemischen, - ein Problem, das sich u.a. bei der Qualitätskontrolle von Arzneizubereitungen ergibt, - ist mit der GC auf gepackten Säulen nicht immer befriedigend durchzuführen, teils weil infolge der großen Zahl ähnlich zurückgehaltener Komponenten keine ausreichende Trennung möglich ist, teils weil Stoffveränderungen an den heißen oder katalytisch wirksamen Oberflächen des GC-Systems befürchtet werden. Die neuere HPLC-Methode bietet vergleichbare oder höhere Trennstufenzahlen und Analysengeschwindigkeiten als die GC auf gepackten Säulen. Stoffveränderungen sind bei Raumtemperatur auf desaktivierten und mit Fließmittel konditionierten Säulenfüllungen bei den, verglichen mit der konventionellen Säulenchromatographie, kurzen Analysenzeiten nicht zu erwarten.

Die Auswahl an Trennsystemen mit unterschiedlicher Selektivität ist in der LC größer als in der GC, da sowohl die stationäre als auch die mobile Phase verändert werden können. Durch die größere Phasenwahl lassen sich für die verschiedenen polaren Terpen-Inhaltsstoffe meist selektivere Trennbedingungen einstellen. Beispielsweise konnten auf unpolaren stationären Phasen mit polaren Fm (Reversed-Phase-Systeme) jene Terpene sehr gut getrennt werden, die sich nur in der Zahl und Stellung der Methyl- bzw. Methylengruppen unterschieden. Die Analyse der sauerstoffhaltigen Inhaltsstoffe gelang dagegen besser auf Kieselgel mit unpolaren Fließmitteln. Diese Systeme trennen bevorzugt nach der Polarität und Stellung der funktionellen Gruppen.

Bei der HPLC-Bestimmung der ätherischen Öle erwies sich die spezifische UV-Detektion als vorteilhaft, da sie bequem zu handhaben ist, gut wiederholbare Detektorempfindlichkeiten besitzt und auf Änderungen der Temperatur oder der Fließmittel-Zusammensetzung kaum anspricht. Auch wurden in den verwendeten

ätherischen Ölen nur wenige Inhaltsstoffe UV-detektiert, die bei entsprechender Selektivität des Trennsystems schnell und auf kurzen Säulen getrennt werden konnten. Es genügte z.B. zur Grundlinientrennung der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen, Pinocarvon, Pulegon, Citral und Piperiton, auf LiChrosorb SI 60 mit dem Fließmittel Petroläther-Dioxan, 99 + 1 (V/V), eine Analysenzeit von 2 min (auf einer 10 cm langen Säule mit etwa 2000 Trennstufen und bei k'-Werten von 2 bis 5).

Die RI-Detektion war dagegen aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit und Unspezifität für die HPLC-Bestimmung der komplexen Ölgemische weniger geeignet. Infolge der Unempfindlichkeit jener Detektoren mußte für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis nahe an der Beladbarkeitsgrenze der Trennsysteme gearbeitet werden, so daß die Probenmengen nur in einem vergleichsweise engen Bereich geändert werden konnten, wenn Einbußen an Trennleistung durch Überladung oder Fehler der elektronischen Integration durch eine zu geringe Detektierbarkeit vermieden werden sollten. Auch werden durch den RI-Detektor, wie durch den FID oder WLD der GC, praktisch alle Inhaltsstoffe angezeigt, wodurch allgemein vielfach größere Trennstufenzahlen und Analysenzeiten als bei der spezifischen UV-Detektion notwendig werden.

Für möglichst genaue RI-Analysen wird man ätherische Öle bevorzugt anhand ihrer Hauptkomponenten bestimmen. Diese werden jedoch auf den besser trennenden Kieselgelphasen häufig bei so unterschiedlichen k'-Werten eluiert (z.B. Cineol oder Menthon gegenüber Geraniol oder Menthol), daß mit verschiedenen Fließmittelstärken gearbeitet werden muß. Eine Änderung der Fließmittel-Zusammensetzung bedingt jedoch ein längeres Durchspülen der Pumpe, des Dämpfungsgliedes und der entsprechenden Kapillarleitungen mit dem neuen Fließmittel. (Die Fließmittelgemische auf der Hochdruckseite herzustellen, hätte eine gestörte RI-Grundlinie und eine schlechtere Wiederholbarkeit der k'-Werte und der Peakflächen zur Folge.) Außerdem muß bei den verwendeten relativ unpolaren mobilen Phasen in der Chromatographie auf Kieselgel mit sehr langen Konditionierungszeiten gerechnet werden.

Beim Vergleich der quantitativen HPLC- und GC-Ergebnisse ergab sich u.a. folgendes (s. auch Tab. 5-1): Beide Verfahren besitzen eine gute, für die Qualitätskontrolle ausreichende Präzision der Peakflächen. Sie war bei externer Standardisierung < ± 1 %. Bei interner Standardisierung wurden in der HPLC mit < ± 0,1 % etwas größere Genauigkeiten als in der GC gefunden. Auch die gefundenen Wiederholbarkeiten der Trennungen sprechen nicht gegen das eine oder das andere Verfahren. Sie gestatten bei beiden Methoden eine Auswertung der Chromatogramme nach der Peakfläche.

Zur Richtigkeit der mit den beiden Verfahren erhaltenen Ergebnisse sei erwähnt: Sieht man von der 100-%-Methode ab, die ohne Korrekturfaktoren bei den Terpenen in der GC mit FID gegenüber den spezifischeren LC-Detektoren noch einigermaßen brauchbare Werte liefert, so werden bei der Auswertung von Chromatogrammen allgemein die Peakwerte der Analyse mit den Peakwerten einer Rein-Substanz (bzw. die Peakflächen im Ölgemisch mit den entsprechenden Peakflächen in den einzelnen Ölen) verglichen. Die Richtigkeit einer chromatographischen Analyse ist also gegeben, wenn die zu bestimmenden Peaks ausreichend abgetrennt sind, Stoffveränderungen ausgeschlossen werden können, im linearen Bereich gearbeitet wird und alle Parameter gut wiederholbar sind. Fehler durch die beiden zuletzt genannten Ursachen konnten durch entsprechende Voruntersuchungen bzw. durch wiederholte Aufgabe einer Kontrollanalyse ausgeschlossen werden.

Stoffveränderungen einzelner Terpen-Inhaltsstoffe waren bei den unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen HPLC- und GC-Trennungen der ätherischen Öle nicht zu erkennen. Zum Nachweis von Zersetzungen wurde daher das relativ labile Citral als Testsubstanz verwendet. In der GC wurden für identische, sehr verdünnte Testlösungen auf verschiedenen Säulen und bei verschiedenen Säulentemperaturen unterschiedliche Citralmengen wiedergefunden. Die erhaltenen Stoffverluste waren jedoch geringer als in der Literatur beschrieben. Für die mit größeren Probenmengen und anhand weniger empfindlicher Terpene

Tabelle 5-1: Vergleich der HPLC und GC - unter besonderer Berücksichtigung der bei den ätherischen Ölen gemachten Erfahrungen

	HPLC		GC (auf gepackten Säulen)
	auf RP	auf SiO_2	
Wiederholbarkeit der Peakflächen (s_{rel} bei externer Standardisierung)	< ± 1 %		< ± 1 %
Wiederholbarkeit der Retentionszeiten	+++	+	+++
Wiederholbarkeit der rel. Retentionen	+++	+++	+++
maximale Trennstufenzahlen	100000 (1 m)		20000 (10 m)
Analysengeschwindigkeiten (N_{eff}/sec)	20 (d_p = 5 µm)		10
Analysendauer	2 - 15 min		5 - 20 min
Selektivität der Trennsysteme	+	+++	++
Eignung zur Analyse von			
Monoterpenen	+	+++	+++
Sesquiterpenen	+	+++	+
Detektoren: Spezifität	+++(UV), -(RI)		- (FID, WLD)
Empfindlichkeit	++ (UV), -(RI)		+++(FID)
Linearität	++ (UV,RI)		+++(FID)
Stoffveränderungen (bei Monoterpenen)	keine		(ja)
Gradientenelution:			
bei qual. Analysen	++	-	+++
bei quant. Analysen	-	-	+++(FID)
Bequemlichkeit die Trennbedingungen einzustellen	+++	-	+++
Preis eines Gerätes incl. Detektor (in DM)			
ohne Gradientenelution	5000 - 20000		2000 - 10000
mit Gradientenelution	20000 - 100000		5000 - 20000
Preis einer fertiggepackten Säule (in DM)	100 - 400		300 - 600
Toxizität der Chemikalien	++		-
Explosionsgefahr	++		++ (bei H_2)
präparative Trennungen	+++	+++(LLC) ++ (LSC)	+

durchgeführten quantitativen GC-Bestimmungen der Öle schienen Fehler durch Zersetzungen vernachlässigbar, zumal die gefundenen Gehalte auch bei veränderten Trennbedingungen gut wiederholbar waren. In der HPLC konnten für Citral auch auf aktiviertem Kieselgel bei Raumtemperatur in dem Fließmittel Petroläther-Dioxan, 98 + 2, keine Stoffverluste nachgewiesen werden. Zersetzungen wurden lediglich an methanolischen Citrallösungen beobachtet, doch sind diese bei den kurzen HPLC-Analysenzeiten nicht von Bedeutung.

Die Abtrennung einer Komponente von den übrigen Inhaltsstoffen ist abhängig von der Trennstufenzahl, der Selektivität des Trennsystems und auch von der Zahl der detektierten Verbindungen. Bei spezifisch zu detektierenden, UV-absorbierenden Öl-Inhaltsstoffen läßt die HPLC im allgemeinen vollständigere Trennungen und damit richtigere Analysen erwarten, denn neben einer Vereinfachung des Analysenproblems infolge der geringeren Zahl der angezeigten Verbindungen bietet sie, wie oben erwähnt, höhere Trennstufenzahlen als die GC auf gepackten Säulen und eine sehr viel größere Zahl an Trennsystemen mit unterschiedlichster Selektivität. Bei unspezifisch zu detektierenden Verbindungen sind die Trennmöglichkeiten der HPLC ebenfalls besser als die der GC, falls sich die zu untersuchenden Stoffe nicht in ihrem Dampfdruck unterscheiden. Andere Eigenschaften der beiden Verfahren lassen jedoch die GC bei der Routine-Bestimmung nicht spezifisch zu detektierender Stoffe vorteilhafter erscheinen. Neben dem Fehlen eines empfindlichen und bequem zu handhabenden, unspezifischen LC-Detektors sind vor allem die Möglichkeiten der Gradientenelution bei den beiden Methoden zu erwähnen.

Gradientenelution ist bei beiden Verfahren erwünscht, z.B., um Komponenten zu bestimmen, die sich in ihren k'-Werten stark unterscheiden oder um langsam wandernde Stoffe, die die nachfolgenden Analysen stören, schneller aus der Säule zu entfernen. Während die dem Fließmittel-Gradienten der LC vergleichbare Temperaturprogrammierung der GC relativ problemlos ist und sich in Verbindung mit massenspezifischen Detektoren (z.B. FID)

gut für quantitative Analysen eignet, sind die Möglichkeiten eines Fließmittel-Gradienten in der LC stark eingeschränkt. Die chem.phys. gebundenen, polaren stationären Phasen, deren Zusammensetzung durch das Fließmittel kontrolliert wird, liefern schlecht wiederholbare Trennungen und erfordern meist lange Rekonditionierungszeiten. Unspezifische Detektoren (z.B. RI-Detektoren), die auch die Änderungen der Fließmittel-Zusammensetzung anzeigen, können praktisch nicht verwendet werden. Aber auch mit spezifischen Detektoren (z.B. UV-Detektoren) in Verbindung mit chemisch gebundenen Phasen (z.B. RP), auf denen sich die Trennbedingungen schneller einstellen lassen, ist eine Gradientenelution für quantitative Bestimmungen nicht zu empfehlen, da die Durchflußrate, und die Fließmittelstärke bei sich ändernder Fließmittelzusammensetzung für konzentrationsspezifische LC-Detektoren nicht genau genug kontrolliert werden können. Schließlich ist die für einen Fließmittel-Gradienten zusätzliche apparative Ausrüstung bei Routineanalysen selten zu rechtfertigen.

Weitere Unterschiede der beiden Verfahren, die besonders bei Routine-Untersuchungen interessieren, sind:

- die Schwierigkeiten, die Trennbedingungen einzustellen und aufrecht zu erhalten. Diese waren in der GC geringer als in der LC auf polaren stationären Phasen mit den verwendeten sehr unpolaren Fließmitteln. - Die leichter zu handhabenden RP-Systeme besitzen für die Terpene allgemein keine ausreichende Selektivität.
- der Preis der Grundausrüstung: Dieser ist in der GC für ein Routinegerät etwa halb so groß wie für ein Ein-Pumpen-HPLC-Gerät (incl. Detektor). Hinzu kommt noch, daß häufig die einfacheren und preiswerteren LC-Detektoren, z.B. UV-Detektoren mit fester Wellenlänge (254 oder 280 nm) für die Untersuchung ätherischer Öle nicht ausreichen.
- die Lebensdauer der Trennsäulen: HPLC-Säulen sind wegen der größeren Schwierigkeiten, Korngrößen < 30 µm zu fraktionieren und gleichmäßig in Säulen zu füllen, teurer als GC-Säulen. Die Haltbarkeit der Säulen müßte in der HPLC bei den an sich in den mobilen Phasen unlöslichen Trägermaterialien

größer sein als bei GC-Säulen, deren Gehalt an flüssiger stationärer Phase allmählich abnimmt. Bei den eigenen Arbeiten bewahrten jedoch die GC-Säulen mit PEG 20000 als stationärer Phase ihre Trenneigenschaften länger als die mit 5 oder 20 µm Teilchen, selbstgefüllten HPLC-Säulen. Das vorzeitige Ende der LC-Säulen wurde weniger auf chem.-phys. Veränderungen des Kieselgels als auf eine Verschlechterung der Packungssymmetrie zurückgeführt.

- die Wahl des Probenlösemittels: Diese wird neben der Löslichkeit und Stabilität der Probensubstanz auch durch die Probenvorbereitung, z.B. durch die Extraktion der Wirkstoffe aus einer Arzneiform, eingeschränkt. Während aber in der GC alle Lösemittel verwandt werden können, die eine ausreichende Flüchtigkeit besitzen und die stationäre Phase oder die Geräteteile nicht angreifen, muß in der LC das Probenlösemittel auch auf das Trennsystem abgestimmt sein, um den chromatographischen Prozeß nicht zu stören; d.h., je nachdem ob polare oder unpolare Lösemittel zur Probenvorbereitung verwendet werden, kann z.B. die Chromatographie auf polaren Sorbenzien oder in RP-Systemen vorteilhafter sein.

Weder mit der HPLC noch mit der GC war es möglich, für jedes der vorgegebenen vier ätherischen Öle geeignete Komponenten zu finden, durch welche eine befriedigende, genaue und richtige Bestimmung der einzelnen Öle in Gemischen möglich gewesen wäre. Es ergab sich vielmehr bei beiden Verfahren - auch bei der geringeren Zahl der UV-detektierten Komponenten - das Problem der hinreichenden Abtrennung der zu bestimmenden Inhaltsstoffe von störenden, meist kleineren Peaks. Entsprechend unterschiedlich waren je nach Auflösung und relativer Peakgröße die Wiederfindungsraten der Öle in den Ölmischungen.

Tab. 5-2 gibt die Bestimmungsmöglichkeiten der verwendeten 4 ätherischen Öle in Gemischen aus denselben anhand der bezeichneten Inhaltsstoffe mittels HPLC und GC wieder. Dabei wurde bei der HPLC auch zwischen UV- bzw. RI-Detektion und zwischen der Chromatographie auf polarer und unpolarer stationärer Phase unterschieden.

Tabelle 5-2: Bestimmungsmöglichkeiten der verwendeten vier ätherischen Öle im Gemischen der Öle mittels HPLC und GC anhand der bezeichneten Inhaltsstoffe

	HPLC	GC (auf gepackten Säulen, FID)
Melissenöl	+++(Citral, UV, SiO_2)	+++(Geraniol)
Menthaöl	+++(Piperiton, UV, SiO_2)	++ (Menthon)
Eucalyptusöl	+ (Pinocarvon, UV, SiO_2) ++ (Cineol, RI, SiO_2)	+++(Cineol)
Pinusöl	+ (ein Sesquiterpenkohlenwasserstoff, UV, RP)	+ (ein Sesquiterpen-KW) + (ein Monoterpen-KW)

Nicht alle der ausgewählten, gut abtrennbaren Komponenten der einzelnen Öle konnten bei isokratischen bzw. isothermen Bedingungen, die für Routineanalysen anzustreben sind, bestimmt werden. In der HPLC mußte neben der Fm-Stärke auch die Art der Detektion und u.U. die Säulenfüllung geändert werden. Bei isokratischen Bedingungen konnten auf Kieselgel mittels UV-Detektion Melissenöl, Menthaöl und mit schlechterer Wiederfingungsrate auch Eucalyptusöl anhand von Citral, Piperiton bzw. Pinocarvon bestimmt werden. Mit besserer Genauigkeit ließ sich Eucalyptusöl - ebenfalls auf Kieselgel - anhand seiner Hauptkomponente Cineol im Ölgemisch nachweisen, doch mußte hierbei der weniger bequem zu handhabende RI-Detektor eingesetzt werden. Für die HPLC-Analyse des Pinusöls war es notwendig, die Trennbedingungen vollständig zu ändern: Ein Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff-Peak konnte auf LiChrosorb RP-8 mit dem Fm Methanol-Wasser, 65 + 35 (V/V) ausreichend von den Komponenten der anderen Öle abgetrennt werden.

In der GC konnten auf PEG 20000 bei programmierter Temperatur ein oder mehrere Peaks der 4 Öle im Gemisch bestimmt werden, wenn auch teilweise nicht mit derselben Richtigkeit wie bei den für die betreffende Komponente ausgearbeiteten, isothermen Trennbedingungen. In der quantitativen GC wurden außer PEG 20000 nur noch PEG 400 (bei der Cineol-Bestimmung) als stationäre Phase verwendet.

Während es also in der GC möglich war, alle 4 Öle auf einer Säule mit programmierter Temperatur einigermaßen richtig im Gemisch der Öle zu bestimmen, mußte in der HPLC bei isokratischer Elution, mit verschiedenen Fließmitteln und Säulenfüllungen und mit dem weniger gut zu handhabenden RI-Detektor gearbeitet werden. Die Einstellung der Trennbedingungen oder das Abwarten einer konstanten RI-Grundlinie erforden jedoch viel Zeit und Arbeit, so daß Routinebestimmungen ätherischer Öle mittels HPLC nur bei großen Probenzahlen zu rechtfertigen sind.

Diese Aussage, ebenso wie die Bestimmungsmöglichkeiten durch die in Tab. 5-2 aufgeführten Stoffe, gelten nur für diese 4 ätherischen Öle bzw. für Öle mit gleicher qualitativer Zusammensetzung. In anderen Ölen können die genannten Komponenten fehlen oder weitere Substanzen vorliegen, welche jene Bestimmungen stören, so daß andere Trennbedingungen oder andere, gut abzutrennende Komponenten gesucht werden müssen.

Es hängt daher auch von der Zusammensetzung der ätherischen Öle ab, ob die eine oder die andere chromatographische Methode quantitativ besser auszuwertende Trennungen liefert. Allgemein wird die HPLC in der Routineanalytik ätherischer Ölgemische immer dann von Vorteil sein, wenn die ätherischen Öle wenige, durch UV-Detektion selektiv zu bestimmende Komponenten enthalten. Diese Stoffe sollten sich aber in ihren k'-Werten nicht so sehr unterscheiden, daß isokratische Elution zu überlangen Analysenzeiten führt oder daß gar mit verschiedenen Fließmittelstärken gearbeitet werden muß. Die GC erscheint dagegen geeigneter, wenn die ätherischen Öle nicht durch spezifisch zu detektierende Inhaltsstoffe bestimmt werden können. Neben der verglichen mit der der RI-Anzeige bequemeren FI-Detektion besitzt jene vor allem den Vorzug der problemloseren Gradientenelution und der leichter einzustellenden Trennbedingungen.

Die Bevorzugung der GC gilt für die Routineanalytik von Monoterpenen, die bei den eigenen Arbeiten bei Säulentemperaturen < 150° C eluiert werden konnten. Bei den höhersiedenden Sesquiterpenen, die ebenfalls in ätherischen Ölen vorkommen, und bei den Di- und Triterpenen ist der Anwendungsbereich der HPLC größer. Die HPLC ist außerdem bei der Aufklärung der Zusammensetzung ätherischer Öle zu empfehlen. Einmal eignet sie sich besser für präparative Trennungen, zum anderen interessieren hierbei auch die empfindlicheren Terpene, die in aus Frischpflanzen schonend isolierten Ölen in größerer Zahl vorkommen als in Handelsölen und deren Bestimmung man bei der Produktkontrolle ätherischer Ölgemische in der Regel umgehen wird. Schließlich ist die HPLC die Methode der Wahl, wenn nur der Gehalt von Inhaltsstoffen interessiert, die eine gute UV-Absorption aufweisen u n d nur in geringer Konzentration vorliegen. Beispiele hierfür sind die Bergapten-Bestimmung in Citrusölen*) und die Citral-Bestimmung in ätherischen Ölen**).

---

*) Bergapten ist das wichtigste einiger phototoxischer Furocoumarine, die meist zu weniger als 1 % in Citrusölen vorkommen[163].

**) Citral wurde von Jones et al.[164] auf eine - verglichen mit obigen LC-Untersuchungen - umständliche Weise bestimmt. Da sich die Alkohole Nerol und Geraniol auf polaren oder mittelpolaren GC-Phasen besser als die entsprechenden Aldehyde, Neral und Geranial, von den übrigen Inhaltsstoffen abtrennen lassen, wurden jene nach Reduktion mit $NaBH_4$ bestimmt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel eines Melissen-, Mentha-, Eucalyptus- und Pinusöls die Möglichkeiten der HPLC im Vergleich zur GC bei der Bestimmung ätherischer Öle in Ölgemischen untersucht. Diese Frage ist besonders bei der Qualitätskontrolle von Arzneizubereitungen von Interesse. Die quantitativen Möglichkeiten der DC wurden nur angedeutet. Sie wurde vor allem bei der Identifizierung der Inhaltsstoffe und zur Ausarbeitung der HPLC-Trennung eingesetzt.

Die Bestimmungen der ätherischen Öle erfolgte meist anhand der sauerstoffhaltigen Terpene, die für die einzelnen Öle in der Regel typischer sind und die sich sowohl durch HPLC als auch durch GC besser trennen lassen. In der HPLC interessierten besonders die gut nachweisbaren, UV-absorbierenden α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen.

Als stationäre Phasen wurden in der GC mit gepackten Säulen mittelpolare Trennflüssigkeiten (z.B. Polyäthylenglykole) verwendet; Säulentemperaturen $< 150°$ C waren ausreichend. In der HPLC wurden unpolare und polare Sorbenzien benutzt. Trennsysteme mit Kieselgel als stationärer Phase besitzen eine stärker zu beeinflussende Selektivität und erlauben bessere Trennungen der sauerstoffhaltigen Terpene. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit der sehr unpolaren Fließmittel sind sie jedoch schwerer einzustellen.

Bei den quantitativen Untersuchungen zeigte sich, daß HPLC und GC eine etwa gleich gute Präzision der Peakflächen ($s_{rel} < \pm 1$ %) gestatten, welche für die Qualitätskontrolle ausreichend ist. Auch die Wiederholbarkeiten der Trennungen waren vergleichbar und rechtfertigten nicht, der einen oder der anderen chromatographischen Methode den Vorrang zu geben. Großes Gewicht wurde daher auf die Beschreibung der Richtigkeit und Zuverlässigkeit, der Trennmöglichkeiten sowie der Schwierigkeiten der Verfahren gelegt, zumal jene Faktoren auch für die Bestimmung anderer ätherischer Öle Gültigkeit haben.

Stoffveränderungen konnten auf LC-Säulen nicht nachgewiesen werden. Sie sind allenfalls bei der Aufbewahrung der Proben in polaren Lösemitteln zu befürchten (z.B. Citral in Methanol). In der GC sind Zersetzungen nicht auszuschließen, bei entsprechender Arbeitsweise jedoch so gering, daß sie in der Routineanalytik von Monoterpenen in Handelsölen vernachlässigt werden können.

Weder mit der GC noch mit der HPLC war es möglich, in allen vier ätherischen Ölen geeignete Komponenten zu finden, die eine genaue Bestimmung der einzelnen Öle im Gemisch mit einer Trennsäule bei isothermen bzw. isokratischen Bedingungen zuließen. Bei beiden Verfahren ergab sich das Problem, die zu bestimmenden Komponenten ausreichend von anderen Inhaltsstoffen abzutrennen, d.h., die Wiederfindungsrate eines Öles im Gemisch war je nach Auflösung und relativer Peakgröße der zu bestimmenden Komponenten unterschiedlich und häufig schlechter als die Genauigkeit der Methode. Die Bestimmungsmöglichkeiten der 4 verwendeten Öle im Gemisch mit der HPLC und der GC anhand der bezeichneten Komponenten sind im folgenden vereinfacht gegenübergestellt.

	HPLC	GC
Melissenöl	+++(Citral)	+++(Geraniol)
Menthaöl	+++(Piperiton)	++ (Menthon)
Eucalyptusöl	+ (Pinocarvon) ++ (Cineol)	+++(Cineol)
Pinusöl	+ (ein Sesquiterpen-Kohlenwasserstoff)	+ (ein Sesquiterpen-KW) + (ein Monoterpen-KW)

Mit der HPLC sind allgemein bei spezifischer Detektion (UV) und bei Vorliegen geeigneter gut UV-absorbierender Verbindungen in den einzelnen Ölen vollständigere Trennungen und schnellere Analysen zu erwarten. Der GC wird man dagegen bei unspezifisch zu detektierenden Verbindungen und bezüglich der Bequemlichkeit des Verfahrens und der Wiedereinstellung und Aufrechterhaltung der Trennbedingungen den Vorzug geben.

7. ALLGEMEINER EXPERIMENTELLER TEIL

7.1. Elektronenspektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman DB-GT Spektralphotometer[165] erhalten. Schichtdicke der Quarzküvetten: 10 mm, Breite 10 mm, nur für die Ermittlung der Maxima der aus dem LC-Eluat gesammelten Fraktionen (s. Abb. 4-9a) wurden Küvetten mit 2 mm innerer Breite verwendet. Monochromatorvorschub 50 nm/min, Spaltprogramm I.

7.2. IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Beckman Accu Lab 2 Spektralphotometer[165] erhalten. Für die Abb. 2-3 wurden die unverdünnten Öle in einer Küvette mit variabler Schichtdicke als etwa 30 µm dicker Film vermessen.

7.3 Gaschromatographie

(Experimentelle Parameter wurden, soweit sie das quantitative Ergebnis beeinflussen, auch in Abschnitt 3.1.3 diskutiert.)

Die gc Arbeiten wurden auf einem Gaschromatograph hp 5711 A[166] ausgeführt, einem Doppelsäulengerät mit heizbarem Einspritzblock, Temperaturprogramm und FID als Detektor. Wahlweise war es möglich, die Probenlösung auf der Oberfläche eines Metalleinsatzes, eines Glasinserts oder auf der Säulenfüllung ("on column") verdampfen zu lassen.

Die Probendosierung erfolgte bei den quantitativen Bestimmungen mit dem automatischen Probengeber hp 5671 A[166] in Verbindung mit 10 µl-Spritzen (Hamilton 701-N[167]) aus halbgefüllten, dicht verschlossen Probengefäßen. Der automatische Probengeber war so eingestellt, daß die Spritze 5 mal 10 µl der Probenlösung und 5 mal mit 2 µl (= dem eingestellten Probenvolumen) gespült wurde. Die zuerst gezogenen 5 mal 10 µl wurden verworfen, während 4 mal 2 µl in das Probengefäß zurückgegeben wurden. Aus einem Probengefäß wurden maximal drei Proben genommen. Sollten mehr als drei Werte pro Analyse ermittelt werden, wurden entsprechend mehr Probengefäße mit derselben Probenlösung gefüllt.

Zur Integration der Peakflächen diente der Integrator hp 3370[166], der direkt mit dem Detektor verbunden war. Die Flächen werden in µVs ausgedruckt. Integrationsstart und -ende werden durch die eingestellte Anfangs- und Endneigung der Kurve eingestellt. Die Arbeitsweise der Integrators kann durch Markierungssignale auf dem Chromatogramm des nachgeschalteten Schreibers hp 7123 A überprüft werden. Nicht in allen Fällen erlaubt das Integrationsproblem bei den vom Integrator gebotenen Möglichkeiten einen völlig automatischen Betrieb des Integrators; z.B. konnte in Abb. 3-13 erst nach dem Lm-Peak von manuellem auf automatischen Betrieb umgeschaltet werden. Es wurde darauf verzichtet, die Integratorprogramme für die einzelnen Trennungen anzugeben. Stattdessen wurden häufig nur die bei der gewählten Einstellung des Integrators erfaßten Teile der Peakflächen in den Chromatogrammen gekennzeichnet.

Verwendete GC-Säulen: Neben den in Tab. 3-5 aufgeführten Säulen wurde bei der Cineol-Bestimmung noch folgende Säule verwendet, für die eine Prüfung auf zersetzende Eigenschaften nicht notwendig erschien: Stahlsäule, 3,2 mm ä.D., 2 m lang, gefüllt mit 10 % PEG 400 auf Kieselgur silanisiert Merck[170], N = 1700 für Cineol (k' = ca. 10) bei 100° C und etwa 20 ml N_2/min.

Herstellen der GC-Säulen: Es wurde mit selbst imprägnierten Säulenfüllmaterialen gearbeitet. Die Belegung erfolgte im Prinzip nach dem bei Kaiser[168] als Methode 1 beschriebenen Verfahren (mit vorgelegter Menge an flüssiger Phase). Abrieb oder aggregierte Teilchen wurden nach dem Imprägnieren durch Sieben entfernt.

Verwendete Trägermaterialien:
Chromosorb ™ W AW DMCS 0,18 - 0,25 mm[169],
Chromosorb ™ G AW DMCS 0,15 - 0,18 mm[169] und
Kieselgur silanisiert Merck 0,2 - 0,3 mm (Art. 9748)[170]

Verwendete Trennflüssigkeiten:
Carbowax 20 M (= PEG 20000) Wilkens Instrument & Research Inc.[171] und Polyäthylenglykol 400 z. Synth., Merck-Schuchardt (Art. 807485)[170].

Zum Füllen der Säulen wurde das Säulenfüllmaterial in kleinen Portionen in die Säule gegeben, durch am Säulenende angelegtes Vakuum vorwärtsbewegt und durch seitliches Klopfen möglichst dicht gepackt. Nur in wenigen Fällen war es notwendig, die Säulen nach dem Konditionieren nachzufüllen. Alle Säulen waren vor dem Füllen gewendelt. Metallsäulen wurden nach dem Reinigen und Trocknen durch Ausspülen mit einer 2 proz. Lösung der Trennflüssigkeit (in Dichlormethan) imprägniert.

Zur Konditionierung der PEG 20000 -Säulen wurde folgendes Verfahren angewandt, das sich auf die Beobachtungen von Aue[172] stützt. Erst wurde 1 bis 2 h mit strömendem Trägergas bei 150° ausgeheizt, dann 2 h ohne Trägergas bei 270°. Anschließend wurde die Säule rasch abgekühlt und mit Trägergas bei 200° mehr als 12 h konditioniert. Die derartig vorbehandelten Säulen ergaben von Anfang an gute Trennstufenzahlen und nicht, wie in der Literatur teilweise bei PEG 20000 beobachtet[z.B. 73], erst im Verlaufe einer mehrwöchigen Benutzung.

Zur Beurteilung der Säulen wurden ihre Trennstufenzahlen, Selektivitäten, Permeabilitäten und ihre zersetzenden Eigenschaften (s. 3,1.3.3) kontrolliert. Die für die Berechnung der Trennstufenzahl (3.1.1.4) benötigte Peakbreite in halber Peakhöhe wurde mit Hilfe einer Meßlupe mit achtfacher Vergrößerung bei entsprechend erhöhtem Papiervorschub gemessen. Für identisches Säulenfüllmaterial wurden teilweise beträchtliche Unterschiede bezüglich der Trennstufenzahl gefunden. Für gleichlange Glassäulen lagen die Trennstufenzahlen zwischen 900 und 1700 pro Meter bei gleichen Testbedingungen. Da diese Säulen auch Unterschiede in der Selektivität (Oberfläche der stationären Phase) zeigten, kann angenommen werden, daß nicht nur die Packungshomogenität sondern auch die Art der Konditionierung von Einfluß auf die Bodenhöhe ist. Als Maß für die Selektivität wurde die relative Retention Neral/Hexadecan (s. Abb. 3-4) verwendet, die bei den Tests auf zersetzende Eigenschaften gleichzeitig ermittelt werden konnte. Säulen mit zu geringer Permeabilität wurden nach Messung der maximalen Durchflußrate bei größtem Druckabfall (Gasdruck am Reduzierventil der Trägergasflasche = 4 bar) ausgeschieden.

Die Belastbarkeit der Säulen mit 5% PEG 20000 auf Chromosorb W dürfte für einige nicht symmetrisch eluierte Komponenten (fronting zeigten z.B. Cineol und Geraniol) bei den verwendeten Probenmengen überschritten sein (10 - 40 µg je Öl). Solange aber durch eine geringe Überladung die Trennung nicht beeinträchtigt wurde, erschien es nicht erforderlich, die Probenmenge zu verringern, zumal dadurch die Bedingungen für die elektronische Integration verschlechtert werden können.

Um zuverlässige Angaben über die Lebensdauer der PEG 20000 Säulen machen zu können, müßten mehrere Säulen über einen Zeitraum von wenigstens einem halben Jahr in Betrieb sein. Bei schonend behandelten PEG 20000 Säulen, die nach dem ersten Konditionieren in der Regel nur bei 180° ausgeheizt wurden, änderten sich während der Arbeit die Trenneigenschaften nicht; bei Säulen dagegen, die wiederholt bei Temperaturen über 200°

konditioniert wurden, nahm die Auflösung des Substanzpaares Neral/Hexadecan allmählich ab. Bei der etwa 10 Tage für die Cineol-Bestimmung benutzten PEG 400 Säule, die an der oberen Grenze der zulässigen Temperatur betrieben wurde, nahmen die Retentionszeiten von Tag zu Tag ab. Die Selektivität des Substanzpaares Cineol/Limonen wurde dadurch aber praktisch nicht beeinflußt. Durch Herabsetzen der Säulentemperatur konnten die Trennbedingungen in gewissen Grenzen wiederhergestellt werden.

Die in der Arbeit angegebenen Retentionszeiten wurden vom Integrator ausgedruckt. Bei kleinen und breiten Peaks können sie u.U. etwas zu groß sein, da jener nicht die Zeit im Peakmaximum stoppt, sondern danach, wenn die eingestellte Neigung der Kurve überschritten wird. Zur Ermittlung der Totzeit, die zur Berechnung der k'-Werte und der mittleren linearen Gasgeschwindigkeit notwendig war, wurde ein kleines Volumen Methan oder Erdgas aus einer 2 ml Einmalspritze auf die Säule gegeben.

Die häufig veränderten gc Parameter, wie Temperaturen oder Trägergasgeschwindigkeiten, wurden der besseren Übersicht wegen bei den einzelnen Abbildungen angegeben. Gründe, die für ihre Wahl ausschlaggebend waren, sind in Abschnitt 3.1 und 3.3 besprochen.

7.4 Dünnschichtchromatographie

(Zur Beschreibung der experimentellen Parameter von dc Trennungen siehe[173])

DC-Kammersysteme

Neben Trogkammern, 20 · 20 · 10, die mit Fm-Dampf gesättigt waren (= gesättigte N-Kammer), wurden folgende Kammertypen verwendet. Bei der DC der Vergleichssubstanzen in verschiedenen Fm (4.2.4.1) wurde mit S-Kammern gearbeitet, die mit einfachen Mitteln her-

zustellen waren: Von der DC-Schicht (auf Glas) wurden rechts und links etwa 1 cm breite Streifen entfernt. Auf die nun freie Trägerplatte wurden Glasstreifen, 20 · 0,7 · 0,1 cm, die von leeren DC-Platten abgebrochen worden waren, gelegt und darüber eine leere Glasplatte von der Größe der Trägerplatte. Das ganze wurde durch Klammern zusammengehalten und zur Entwicklung in eine normale Trogkammer gestellt. Die lichte Höhe der S-Kammer betrug 0,75 mm. Glasstreifen oder Deckplatten aus gewöhnlichem Fensterglas (4 mm Dicke) erwiesen sich als ungeeignet, da dieses weniger plan ist als das für die DC-Platten verwendete Glas. Ähnliche S-Kammern sind in der Literatur[174] beschrieben. Vorzüge der selbstgebauten S-Kammern gegenüber den mit Hilfe der Vario-KS-Kammern[89,175] zusammengesetzten S-Kammern sind:

- Die Fm-Front läuft besser waagerecht.
- Durch Einstellen der S-Kammern in einen normalen Fm-Trog lassen sich mit geringem Aufwand mehrere Platten gleichzeitig entwickeln.

Für die DC bei verschiedenem Wassergehalt des Kieselgels (4.2.4.4) wurde mit der Vario-KS-Kammer gearbeitet. Nach Vorbedampfung der lufttrockenen Schichten mit entsprechend konzentrierten Schwefelsäure-Wasser-Mischungen wurden durch Einschieben eines als Gegenplatte dienenden Metallschiebers die Bedingungen einer ungesättigten S-Kammer geschaffen. Zur Einstellung von 50 % rel. Feuchte wurde 0,5 h, für 20 und 80 % rel. Feuchte je 1 h vorbedampft.

Verwendete Kieselgelplatten

Es wurden fast ausschließlich Kieselgelplatten F 254/366, Woelm (Nr. 04613)[176] verwendet. Nur für die Remissionsmessungen wurde mit Kieselgel-60 Platten Merck[170] ohne Fluoreszenzindikator (Art.5721) gearbeitet. Schichtdicke in beiden Fällen 0,25 mm. In ihren Eigenschaften unterschieden sich die Fertigplatten der beiden Hersteller kaum. Die Fließgeschwindigkeiten

waren fast gleich. Der größte beobachtete R_f-Wert-Unterschied war 0,04 bei einem R_f von 0,5. Sehr nahe beeinander liegende Stoffe wurden zum Teil auf dem einen zum Teil auf dem anderen Fabrikat besser getrennt. Bei einigen Spurenkomponenten des Melissenöls, die in Dichloräthan bei R_f-Werten kleiner 0,15 liegen, wurden Unterschiede in der Elutionsfolge beobachtet. Vermutlich haben die nicht bekannten Binder einen Einfluß auf die Selektivität der Trennung.

Wenn nicht anders angegeben, befand sich der Wassergehalt der Kieselgelschicht vor der Entwicklung im Gleichgewicht mit der relativen Feuchte der Raumluft. Diese war gut konstant und bewegte sich aufgrund der Hygrometeranzeige zwischen 47 und 50 %. Aufgrund der R_f-Werte, welche nach der mit Schwefelsäure-Wasser-Mischungen kontrollierten Wasserbelegung gefunden wurden, müßte die rel. Feuchte der Raumluft geringer sein: etwa 40 % rel. Feuchte.

In wenigen Fällen wurde in der DC auch mit "reversed-phase"-Systemen gearbeitet, sei es, um die Reinheit eines Vergleichsstoffes zu kontrollieren oder um Anhaltspunkte über die relative Retention zweier Stoffe auf RP-Säulen zu erhalten. Auf Kieselgel silanisiert (mit DMCS) -Fertigplatten Merck (Art. 5746) wurde z.B. in gesättigter N-Kammer mit Methanol-Wasser, 60 + 40 (V/V), für Pulegon ein R_f von 0,34 erhalten (10 cm Entwicklungsstrecke in 60 min). Vorausgesetzt, daß die Vorbedmmpfung der Schicht gering ist und daß keine Fm-Entmischung während der Chromatographie eintritt, entspräche dieser R_f einem k' von etwa 2 (s.a. Tab. 4-7). Für Fm mit geringerem Methanolgehalt ($\leq$ 50 %) waren die Platten ungeeignet. Die Schicht (das Bindemittel) quillt und löst sich teilweise von der Glasplatte ab. Die Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure wurde durch das Bindemittel nicht gestört.

Fließmittel

Um einen eventuellen Einfluß des Wassergehaltes der Fm auf die unteren R_f-Werte klein zu halten, wurden diese durch Mischen von gleichen Teilen getrocknetem und wassergesättigtem Lösemittel auf einen mittleren Wassergehalt eingestellt. Für die DC bei 20 oder 80 % rel. Feuchte wurde trockenes bzw.wassergeättigtes Fm verwendet. Die Einkomponenten-Fm konnten für die Entwicklung mehrerer Platten verwendet werden, ohne daß bedeutende R_f-Unterschiede beobachtet wurden.

Laufstrecke und Entwicklungszeiten

Entwicklungsstrecke bei allen Chromatogrammen: 10,0 $\pm$ 0,5 cm;
Entfernung der Startpunkte vom unteren Plattenrand: 3,0 cm;
Entwicklungszeiten für die lufttrockenen Kieselgelschichten Woelm in der S-Kammer: für Toluol 35 min
für Dichloräthan 45 min
für Butyläther 45 min.

Auftragen der Proben, Probenmenge und -Lösemittel

Für punktförmiges Auftragen wurde eine 10 ul GC-Spritze (Hamilton 701-N[167]) verwendet, deren Spitze teilweise abgestumpft worden war. Die Nadelabschrägung betrug 17°. Jork[177] hält eine Abschrägung von 25° für geeignet, um ein Hochkriechen der Probenlösung an der Aussenwand der Spritzennadel zu vermeiden, wie dies bei einem Abschrägungswinkel von 90° leicht der Fall sein kann. Für strichförmiges Auftragen wurden 15 nebeneinander liegende 1 µl Microcaps (end-to-end) -Pipetten verwendet, die zwischen 2 Glasstreifen (1 cm breit) mit Klebeband befestigt waren. Für quantitatives Arbeiten war diese Vorrichtung nicht geeignet, da sich beim Füllen der Kapillaren durch Eintauchen die Probenlösung auch außen zwischen den Kapillaren hochzieht. Strichförmig wurde nur bei den DCs aufgetragen, die densitometrisch ausgewertet wurden. Strichförmiges Auftragen hatte den Vorzug, daß bei schiefer Entwicklung eines Chromatogrammes, der Lichtstrahl

bei der Remissionsmessung nicht so schnell auf substanzfreie DC-Schicht trifft. Daneben zeigen bei Überladung der Schicht die DC-Zonen keine so starke Verformung wie bei punktförmigem Auftragen.

Bei den Vergleichssubstanzen waren in der Regel bei punktförmigem Auftragen 2 nl (bzw. µg) Probenmenge für eine gute Detektierbarkeit ausreichend (z.B. 1 µl einer 0,2 proz. Lösung). Bei schwer nachzuweisenden Stoffen wurden nicht mehr als 10 nl verwendet, um fehlerhafte R_f-Werte infolge Überladung der stationären Phase auszuschließen. Für die strichförmigen Chromatogramme wurden je 150 nl und 600 nl ätherisches Öl verwendet (15 µl bzw. 60 µl der 1 proz. Lösungen).

Als Lösemittel für die Proben wurde Cyclohexan verwendet. Kohlenwasserstoffe besitzen ein ausreichendes Lösungsvermögen für die untersuchten Vergleichsstoffe (ausgenommen für Vanillin), geben kaum zu Reaktionen in der Probenlösung Anlaß und haben eine so geringe Fm-Stärke, daß beim Auftragen auch ohne große Sorgfalt kleine Fleckdurchmesser ($\leq$ 2 mm) erhalten werden. Cyclohexan dampft ausreichend schnell von der DC-Schicht ab, doch würden Spuren des Lösemittels am Startpunkt das chromatographische Ergebnis nicht beeinflussen.

Beladbarkeit der Kieselgelschicht

In den verschiedenen dc Systemen wurde bei den ätherischen Ölen nur eine Art der Überladung beobachtet, die der stationären Phase. Der Einfluß der Probenmenge auf die R_f-Werte wurde nur in einem Fall untersucht (Abb. 7-1). Es zeigt sich, daß Piperitonmengen größer 10 nl deutlich falsche R_f-Werte ergeben - in diesem chromatographischen System, für diese Wanderungsstrecke und bei 0,25 mm Schichtdicke. Snyder (zitiert in Geiss[85]) gibt als Belastbarkeitsgenze der DC für 0,25 mm Kieselgelschichten bei mittlerer Aktivität (etwa 40 % rel. F.) 5 bis 50 µg an, je nach Probensubstanz und Fm.

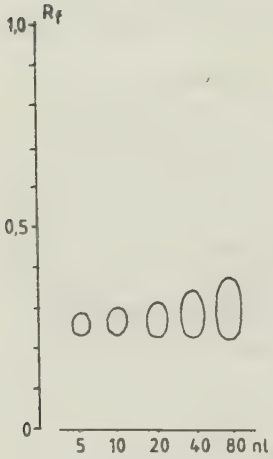


Abb. 7-1:
Beladbarkeit der Kieselgel-Schicht;
Kieselgel-Fertigplatten Woelm F 254/366,
50 % rel. Feuchte;
Fm: Dichloräthan, ungesättigte S-Kammer,
Probenmenge: 5, 10, 20, 40, und 80 nl
Piperiton;
Detektion durch Fluoreszenzlöschung bei
254 nm.

Detektion

Die entwickelten Platten wurden nach dem Trocknen an der Luft oder in der Zugluft des Abzuges sofort ausgewertet:

a) durch Fluoreszenzlöschung
b) mit Vanillin-Schwefelsäure
c) mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure
d) mit Wasser
e) mit anderen Sprühreagenzien.

Gewisse Schwierigkeiten bereitete das Abdampfen des Butyläthers oder der Verunreinigungen desselben, doch mußte dies aus den oben erörterten Gründen (4.2.3.2) hingenommen werden.

zu a) Fluoreszenzlöschung: UV-absorbierende Flecken werden bei der Detektion durch Fluoreszenzlöschung - besonders bei seitlicher Betrachtung - etwas verschoben vom tatsächlichen Ort gesehen. Die Fleckverschiebungen können bis zu 2 mm ausmachen. Um richtige R_f-Werte zu erhalten, ist es daher besser, die Platte quer zur Fm-Richtung zu betrachten und auszuwerten.

zu b) Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure: Pro 20 · 20 cm DC-Platte wurden etwa 20 ml einer Lösung von Vanillin-Schwefelsäure 96 % -Äthanol 99 %, 1 + 5 + 94 (G/V/V), versprüht[178]. Die Platten wurden anschließend im Trockenschrank 5 - 10 min bei 80 - 90° erwärmt. Von den verwendeten Vergleichssubstanzen erscheint unter diesen Bedingungen nur Menthofuran direkt beim Besprühen, die anderen Substanzen erst während des Erwärmens im Trockenschrank. Auf die Wiedergabe der Fleckfärbungen wurde verzichtet, da diese u.a. abhängig sind von der Heizzeit und -temperatur, der versprühten Menge an Schwefelsäure oder Vanillin und dem Plattenfabrikat. Auch verändern sich die Farben im Verlauf von wenigen Stunden. Um ein Verblassen der Flecke zu verzögern, wurden die DCs nach dem Entwickeln im Trockenschrank unter Glasplatten aufbewahrt. Verwendet man als Sprühreagens Vanillin-Schwefelsäure, 1 + 100, so zieht die Schicht später Wasser an und es entstehen durchsichtige, unansehnliche und schlecht haltbare Platten. Auch ist konz. Schwefelsäure schwer gleichmäßig zu versprühen (Ausbildung größerer Tröpfchen). Gegenüber anderen aromatischen Aldehyden, gelöst zu je 1 % in Schwefelsäure + Äthanol, 5 + 95, wie Anisaldehyd, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, p-Dimethylaminobenzaldehyd, ergab das Vanillin-Sprühreagens die empfindlichsten Färbungen. Um nicht täglich das nicht haltbare Sprühreagens neu herstellen zu müssen, wurde eine 1 proz. Lösung von Vanillin in Äthanol vorrätig gehalten. Bei Bedarf wurden dieser Lösung etwa 5 Vol-% Schwefelsäure zugemischt. Abhängig von der beim Mischen entstehenden Wärme färbt sich die Lösung rosa bis schwach violett, wodurch jedoch die Detektion nicht gestört wird. Kieselgel-Folien Woelm (auf Aluminium, Nr. 04688) waren für die Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure oder Kaliumpermanganat-Schwefelsäure ungeeignet. Mit Vanillin-Schwefelsäure wird die Schicht beim Erwärmen dunkelviolett bis schwarz, mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure wird sofort beim Besprühen die ganze Schicht oxidiert.

zu c) Detektion mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure: Weil mit Vanillin-Schwefelsäure einige Stoffe nicht oder nicht empfindlich genug angezeigt werden (z.B. Campher, Menthon) oder um

auszuschließen, daß aufgrund der noch relativ spezifischen Vanillin-Schwefelsäure-Detektion eine Nebenkomponente, die sich besser anfärbt, für die Hauptkomponente gehalten wird, wurde in einigen Fällen mit dem wenig spezifischen Kaliumpermanganat-Schwefelsäure-Reagens gearbeitet (0,5 g $KMnO_4$ auf 15,0 ml Schwefelsäure 96 %[179]). Pro 20 · 20 cm Platte wurden 3 - 4 ml des Reagenzes versprüht. Die Flecke erscheinen weiß oder schwach bräunlich auf braunem Grund. Wurde zuviel Reagens auf die Platte gebracht, so entstanden teilweise große weiße Flächen, die eine Detektion aller Zonen unmöglich machten. Einige Inhaltsstoffe (Cineol, Campher) erscheinen erst nach kurzem Erwärmen im Trockenschrank (bis zu 100°). Vor dem Xerokopieren der eingezeichneten Zonen zur Dokumentation der DCs erwies sich das Besprühen mit 30 proz. Wasserstoffperoxid-Lösung zum Entfärben des braunen Hintergrundes als geeignet.

zu d) Detektion mit Wasser[180]: Diese wurde ähnlich wie die Detektion mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure bei den mit Vanillin-Schwefelsäure kaum anfärbbaren Stoffen oder auch bei Unsicherheiten bezüglich der Haupt- oder Nebenkomponente eines Gemisches angewandt. Es ist jedoch schwer, die für eine gute Erkennung der Zonen richtige Wassermenge aufzubringen, so daß überwiegend mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure gearbeitet wurde.

zu e) Detektion mit anderen Sprühreagenzien: Versuchsweise wurden auch $SbCl_3$- und $SbCl_5$-Lösungen oder Dinitrophenylhydrazin-Lösung verwendet. Die Antimonchlorid-Lösungen geben für die verschiedenen Terpene wenig unterschiedliche Färbungen und sind weniger empfindlich als Vanillin-Schwefelsäure. Mit Dinitrophenylhydrazin reagieren einige Ketone, besonders Campher, sehr langsam. Diese sind nicht oder nicht empfindlich genug nachzuweisen.

Richtigkeit der angegebenen R_f-Werte

Es wurde darauf geachtet, daß die oben diskutierten Fehler durch Überladung der Schicht oder durch unrichtiges Erkennen einer fluoreszenzlöschenden Zone ausgeschlossen waren. Bei Isomerengemischen, die nur teilweise getrennt waren (z.B. Cit-

ral) wurde der mittlere R_f-Wert angegeben. Auf eine Korrektur der R_f-Werte, wenn die als Standard mitchromatographierte Substanz einen abweichenden Wert ergab, wurde verzichtet. Dadurch wäre zwar für Substanzen mit ähnlichem R_f eine bessere Übereinstimmung erreicht worden, nicht jedoch für weit davon entfernt wandernde Stoffe. Besonders für die nahe der Front wandernden Substanzen entstehen größere Fehler beim Umrechnen in R_{St}-Werte. Die angegebenen R_f-Werte sind auf 0,5 hR_f gerundet.
In einigen Fällen bereitete das Auffinden der Hauptkomponente bei den zum großen Teil unreinen Vergleichssubstanzen Schwierigkeiten, wenn Vanillin-Schwefelsäure zur Detektion verwendet wurde. Diese zeigt die Terpene sehr unterschiedlich an, so daß der am intensivsten gefärbte Fleck durchaus ein Verunreinigung der Vergleichssubstanz sein kann. Um derartige Verwechslungen auszuschließen wurde darauf geachtet, daß der gefundene R_f mit der Struktur der Verbindung und mit Literaturdaten, soweit vorhanden, übereinstimmte oder es wurden unspezifischere Detektionsmittel herangezogen.

Quantitative dc Untersuchungen

Die in Tabelle 4-4 gemachten quantitativen Angaben wurden durch visuellen Vergleich der Flecke ermittelt. Da es sich um orientierende Voruntersuchungen handelte, wurden diese Bestimmungen nicht mit letzter Genauigkeit durchgeführt; auch waren die noch ungereinigten Vergleichsstoffe verwendet worden. Die R_f-Werte lagen für die zu bestimmenden Inhaltsstoffe zwischen 0,3 und 0,7. Die Probenmengen wurden so gewählt, daß Konzentrationsunterschiede gut zu erkennen waren. Zur Detektion wurde die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion verwendet.

UV-Remissionsmessung

Die Remissions-Orts-Kurven der Abb. 4-5 sowie die Remissionsspektren der einzelnen Flecke wurden mit einem Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometer (für die DC nach Stahl)[181] aufgenommen. Die Meßfläche betrug 6 · 3 mm, der Vorschub der DC-Platte war 60 mm/min.

Die Remissionsspektren der identifizierten Verbindungen stimmten mit denen der Vergleichssubstanzen überein. Für die Interpretation der Remissionsspektren unbekannter Verbindungen ist zu berücksichtigen, daß die in situ gemessenen Remissionsspektren gegenüber Lösungsmittelspektren eine bathochrome Verschiebung aufweisen, die abhängig ist von der Partikelgröße und der Schichtdicke des Trägers und die für Carbonylverbindungen bis zu 8 nm gegenüber den Spektren in Äthanol betragen kann[182]. Bei den eigenen Werten wurden noch größere Verschiebungen gefunden, doch ist zu berücksichtigen, daß die Remissionsmaxima weniger ausgeprägt waren als die Lösungsmittelspektren und nicht so genau gemessen werden konnten.

	Remissionsmaximum (aus Tab. 4-4)	Maximum der Literatur (aus Tab. 2-1)
Citral	250 nm	237 nm in Äthanol
Pulegon	265 nm	245 nm in Heptan
Piperiton	245 nm	235 nm in Äthanol

7.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

(Experimentelle Parameter wurden, soweit sie das quantitative Ergebnis beeinflussen, auch in Abschnitt 4.3.4 diskutiert)

Apparative Ausrüstung

Für die HPLC-Arbeiten stand ein Flüssigchromatograph hp 1010 A (identisch mit Hupe & Busch UFC 1000)[166] zur Verfügung, der mit Einschüben für die Säulenraumheizung (Luftthermostatisierung), Gradientenelution, Durchflußprogrammierung und automatischen präparativen Betrieb ausgestattet war. Die Lösemittel konnten im Vorratsgefäß erwärmt und durch Vakuum (< 0,3 bar) entgast werden. Der Druck wurde durch eine Orlita[151] Doppelkopfmembranpumpe DMP 1515/3 erzeugt, deren maximale Förderleistung nach dem Dämpfungssystem ohne weiteren Gegendruck noch etwa 8,0 ml/min beträgt. Analytische Probenmengen wurden mit 5 µl Spritzen (SGE 5 BH-R[183]) im Schleusenverfahren bei fördernden Pumpen kurz vor der Säule entleert. Die Säulen wurden waagerecht eingebaut.

Zur Detektion wurden verwendet:
a) ein Schoeffel[184] Zweistrahl-UV-Detektor mit variabler Wellenlänge, Spektroflow SF 770, ausgerüstet mit einer D_2-Lampe (200 - 400 nm) und einer Durchflußzelle (z-förmig, 10 mm Weglänge und 8 µl Zellvolumen). Das Totvolumen der Zuleitungen ist für die Bandenverbreiterung bei den verwendeten Säulendimensionen vernachlässigbar klein (20 cm Teflonschlauch mit 0,3 mm i.D.),
b) ein nach dem Fresnel-Prinzip arbeitender Differential-Brechungs-Detektor, LDC[185]-refractoMonitor 1103, bestückt mit Prisma A für Brechungsindizes von 1,31 - 1,45 (Zellvolumen 5 µl, Volumen des vorgeschalteten Wärmeaustauschers etwa 100 µl).
Neben dem in der GC verwendeten Schreiber wurde in der HPLC meist ein hp Schreiber 7128[166] verwendet, dessen Zeitkonstante größer ist als die des in der GC benutzten hp 7123-Schreibers, aber für nicht zu schnelle Trennungen noch ausreichen dürfte.
Der Integrator ist derselbe wie in der GC (7.3).
Zur Entgasung der Fm (bis zu 1 l) und zur Bereitung der Suspensionen wurde eine Ultraschallwanne Bandelin[186] Sonorex TK 52 (Betriebsfrequenz 40 kHz, HF-Nennleistung 100 W) verwendet.

Fließmittel-Vorbereitung

Entgasen der Fm war bei UV-Detektion nicht unbedingt erforderlich, da der Gegendruck nach der UV-Zelle durch die englumigen Kapillarleitungen meist hoch genug ist. Auch gestattet die Form der UV-Zelle bei den großen Fließgeschwindigkeiten kaum ein Festsetzen der Luftblasen. Wird jedoch mit stehendem Fm in der UV-Vergleichzelle gearbeitet, so sollte das Fm entgast sein. Entgaste Fm sind auch bei RI-Detektion zu verwenden. Zwar läßt sich die Bildung von Luftblasen in der Probenzelle unterdrücken, indem man den Gegendruck nach der RI-Zelle z.B. durch eine 0,5 bis 1 m lange Kapillare mit 0,3 mm i.D. erhöht; da aber die Referenzzelle mit demselben Säuleneluat gefüllt wurde, würde es sehr bald zur Bildung von Luftblasen im stehenden Fm kommen, wenn zuvor nicht gründlich entgast worden ist.
Mehrkomponenten-Fm, die auf der Niederdruckseite gemischt worden waren, wurden durch 3 bis 5 min Ultraschall entgast, da durch Anlegen von Vakuum die Fm-Zusammensetzung verändert werden kann,

besonders wenn die polare Fm-Komponente mit der unpolaren Fm-Hauptkomponente ein niedriger siedendes Azeotrop bildet. Wurden die Fm auf der Hochdruckseite hergestellt, so konnten die reinen Lösemittel auch durch Unterdruck unter heftigem Rühren entgast werden. Besonders kritisch ist das Entgasen von Methanol und Wasser, wenn diese auf der Hochdruckseite gemischt werden sollen, da mit der beim Mischen eintretenden Volumenkontraktion die Löslichkeit für Gase beträchtlich abnimmt. Vor Einschalten der Vakuumpumpe des Flüssigchromatographen wurde daher Wasser auf 82° und Methanol auf 47°C erwärmt und nach dem Entgasen bei diesen Temperaturen belassen, um die Wiederaufnahme von Luft gering zu halten. Durch Entgasen konnte in einigen Fällen die UV-Durchlässigkeit der Fm bei kürzeren Wellenlängen geringfügig verbessert werden.

Einstellen des Wassergehalts der Fm: Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden wie z.B. bei den Fm aus Petroläther und Methanol getrocknete Lösemittel verwendet. Dabei ist zu beachten, daß bereits geringste, praktisch nicht zu messende Änderungen des Wassergehalts zu einer, wenn auch bei so unpolaren Fm sehr langsamen Drift der Retentionszeiten und u.U. der Selektivität führen. Wenn mit Kieselgel-60-Vorsäulen mittlerer Aktivität gearbeitet wurde, brauchte der Wassergehalt der Fm nicht beachtet zu werden. Da jedoch die Lm durch die vorhergehende Reinigung meist auch trocken waren, wurde dem Fm häufig etwas Wasser zugesetzt, um die Vorsäulen möglichst selten erneuern zu müssen. Hierzu wurde das zugegebene Wasser in der polareren Fm-Komponente gelöst. Würde man das Wasser zum fertigen Fm-Gemisch geben, so können bei den verwendeten Fm auch nach mehrstündigem Rühren oder nach Ultraschallbehandlung keine klaren Lösungen erhalten wrrden. Als Anhaltspunkt für die zuzusetzende Wassermenge diente die Arbeit von Thomas[155].

Fließmittel-Förderung

Bei den quantitativen Bestimmungen, bei RI-Detektion und bei den Retentionszeitmessungen für die k'-Wert-Tabellen wurde zugunsten der Genauigkeit (besonders bei den RP-Systemen) das Fm auf der Niederdruckseite gemischt und mit nur einem Pumpenkopf gefördert. Nur bei der Ausarbeitung von Trennungen oder wenn

die Säule wiederholt zur Entfernung schwer eluierbarer Probenbestandteile mit stärkerem Fm durchgespült werden mußte, war es bei isokratischer Elution günstiger, das Fm mit Hilfe der beiden Pumpenköpfe auf der Hochdruckseite zu mischen, um das Zeit und Fm kostende Durchspülen der Zuleitungen möglichst zu vermeiden.
Beim Mischen von Fm aus Methanol und Wasser auf der Hochdruckseite wurden wiederholt andere Retentionszeiten gefunden als wenn dasselbe Volumenverhältnis auf der Niederdruckseite hergestellt wurde. Die Ursachen hierfür könnten sein: unrichtige Volumenanzeige, eine andere Temperatur der Lm in den Pumpen oder andere Faktoren, z.B. die mit dem Mischen der beiden Lm verbundene Volumenkontraktion oder die freiwerdende Mischungswärme, die sich auf die Säulentemperatur auswirkt.
Da für die Pumpenköpfe vom Geräte-Hersteller keine Wasserthermostatisierung vorgesehen war, wurde die im Pumpenraum entstehende Wärme durch Ventilatoren abgeführt.

Probendosierung

Die 5 µl Spritzen wurden in der Regel etwa 10 mal mit der nächsten Probenlösung gespült. Wurde zuvor eine Probenlösung verwendet, die mehr als 10 mal so große Peaks ergibt, so war noch gründlicheres Spülen der Spritze erforderlich. Vor dem Einführen der Spritze in die Schleuse wurde die Spritzennadel bis auf wenige mm an der Kanülenspitze außen sorgfältig mit Zellpapier abgewischt; anderenfalls wäre eine geringere Präzision der Probendosierung nicht auszuschließen, auch würde die Schleuse mit Probenbestandteilen verunreinigt, die beim Schließen derselben ebenfalls auf die Säule gelangen. Bei schnellen Analysen war es notwendig, die Spritze sofort nach dem Einführen in die Schleuse zu entleeren, da sonst ein, wenn auch geringer Teil der Probe aus dem vorderen Ende der Spritzenkanüle weggespült würde, was zu einer Überlagerung zweier Chromatogramme führen würde. Eine Möglichkeit, letzteres zu vermeiden, wäre auch, nach dem Aufziehen des gewünschten Probenvolumens das vordere Ende der Spritzennadel mit dem Fm oder dem Proben-Lm zu füllen.

Gebrauch der Detektoren

UV-Detektor: Bei den quantitativen Arbeiten war die Vergleichszelle stets mit Fm oder einem höhersiedenden, ähnlich UV-durchlässigen Lm gefüllt, z.B. mit Heptan anstelle von Petroläther-Dioxan, 99 + 1. Ist die Referenzzelle nur mit Luft gefüllt, so kann eine verminderte Linearität der Detektoranzeige nicht ausgeschlossen werden; dasselbe gilt für eine ungleiche Absorption der beiden UV-Zellen z.B durch unterschiedliche Verschmutzung der Zellfenster[159, S.202].

RI-Detektor: Bei dem verwendeten Detektor-Typ wird die Differenz zwischen Proben- nnd Vergleichszelle gemessen, d.h., beide Zellen müssen stets mit Fm gefüllt sein. Um nicht mit einer Referenzsäule arbeiten zu müssen, wurde nach Gleichgewichtseinstellung in der Säule beide Zellen nacheinander mit Fm durchgespült. Danach wurde die Verbindung zwischen Proben- und Referenzzelle wieder getrennt und die Enden der Zu- und der Ableitung der Referenzzelle in das aufgefangene Säuleneluat eingetaucht. Von Zeit zu Zeit wurde dieser Vorgang wiederholt. Bei gut entgasten Fm blieb die Referenzzelle über mehrere Stunden blasenfrei.
Auf eine Thermostatisierung der RI-Zellen mittels Wasserbad wurde verzichtet,
- da - besonders bei erhöhter Säulentemperatur - die Temperatur des in den RI-Detektor eintretenden Säuleneluats nicht bekannt ist,
- da durch Thermostatisierung keine gleichbleibendere Grundlinie erhalten wurde,
- da sich gezeigt hatte, daß eine Drift der Temperatur in einem mittleren Bereich nur die Höhe der Grundlinie aber kaum die Peakflächen beeinflußt.

Besonders bei UV-Detektion wurde ein geringeres Grundlinienrauschen gefunden, wenn die Verbindung zwischen Säule und Detektor gegen Zugluft geschützt war. Bei quantitativen Arbeiten wurden daher auch bei unempfindlicher Detektoreinstellung jene Teile wärmeisoliert, um die Bedingungen für die elektronische Integration zu verbessern.

Sollten beide Detektoren gleichzeitig verwendet werden, so wurde der RI-Detektor wegen des größeren Volumens des Wärmeaustauschers und der damit verbundenen Zonenverbreitung hinter dem UV-Detektor angeordnet.

Integration der Peakflächen

Wie in der GC wurde darauf verzichtet, die für die einzelnen Trennungen verwendeten Integratorbedingungen anzugeben. Bei den LC-Trennungen war es nur selten möglich, den Integrator völlig selbstständig arbeiten zu lassen. Durch die negativen Ausschläge in Verbindung mit dem Lm-Peak (bei UV- und zuweilen auch bei RI-Detektion) kann bei verzögerter Basislinienkorrektur nicht automatisch gearbeitet werden; der Integrator muß nach Durchgang der negativen Peaks von manueller auf automatische Arbeitsweise umgestellt werden. Für die LC mit automatischer Probendosierung wäre dieser Integrator, der für Gaschromatogramme entwickelt wurde, also allenfalls in Verbindung mit einem Zeitfenster zu empfehlen.

Säulenfüllmaterialien

Kieselgel 60 Merck[170], 40 - 63 µm (Art. 9385), das für die Vorversuche mit trocken gefüllten Säulen (4.3.3.3)und für die Vorsäulen zur Kontrolle des Wassergehalts der Fm verwendet wurde, war zur Entfernung feiner Teilchen mindestens 5 mal in Wasser aufgeschwämmt und sedimentiert und im Vakuumtrockenschrank bei < 100 Torr und bei 140° C mehr als 24 h getrocknet worden. Zur Einstellung der Aktivität wurde es mit der jeweils angegebenen Wassermenge (G/G) versetzt, umgeschüttelt und mehr als 12 h stehengelassen.
LiChrosorb® (früher Merckosorb®) SI 60, 5 und 10 µm (Merck Art. 9388 bzw. 9387) und
LiChrosorb® RP-8, 10 µm, (Merck Art. 9318) wurden in der Regel ebenfalls durch Sedimentation von feinen Anteilen befreit, wobei je nach Benetzungsfähigkeit und Korngröße Aceton, Methanol, Isopropanol, Dioxan u.a. organische Lm verwendet wurden.

Vydac^{TM}-101 SI[187] und Vydac^{TM}-201 RP[187], 30 - 44 µm, zeigten unter dem Mikroskop neben sphärischen Teilchen auch Glassplitter mit bis zur fünffachen Länge der sphärischen Teilchen und wurden daher durch Sedimentation in Cyclohexanol von gröberen und durch Sedimentation in Isopropanol von feineren Anteilen befreit.

Die bereiteten Suspensionen wurden vor der ersten Sedimentation jeweils kurze Zeit (< 1 min) in ein Ultraschallbad (s.o.) gehalten; dadurch sollte der an größeren Partikeln haftende Staub wirkungsvoller abgetrennt und die Aufschwämmung entgast werden.

Säulenwandmaterial

Die verwendeten Leersäulen waren aus rostfreiem Stahl. Sie wurden durch Hewlett-Packard[166] geliefert; nur Säulen mit 10 und 15 cm Länge wurden in der Institutswerkstatt aus 50 cm langen Säulen hergestellt. Auf das Aufbohren der Säulen zur Erzielung einer glatteren Rohrwandung wurde verzichtet. Vor dem Säulenfüllen wurden die Säulen mit einer heißen Lösung eines Laborspülmittels unter Zuhilfenahme von Ultraschall, Pfeifenreinigern oder Rohrbürsten gereinigt, mit heißem Wasser und Aceton gespült und getrocknet.
Für die trocken zu füllenden Dünnschichtteilchen, 30 - 44 µm wurden Säulen mit 2 mm i.D. und 50 cm Länge und für die naß zu füllenden, durch-und-durch porösen Teilchen mit Korngrößen ≤ 10 µm wurden 3 mm i.D. Säulen mit 10, 15 und 25 cm Länge verwendet. Größere Säulen wurden durch Koppeln mit totvolumenarmen Verbindungsstücken erhalten.

Füllen der Säulen[107,110,111,188-192]

Die gezeigten Trennungen wurden auf selbst gefüllten Säulen ausgeführt. In Tab. 7-1 sind die Testergebnisse einiger Säulen wiedergegeben.

Tabelle 7-1: Testbedingungen und Eigenschaften der gefüllten LC-Säulen

a) trocken gefüllte Säulen

Säulen-Nr.	Länge + i.D. (cm) der Säule	Säulenfüllmaterial	Packungsdichte (g/ml)	Testsubstanz[a] (k'-Wert)	Fm und Säulentemperatur[b]	theoretische Bodenhöhe, H, (mm)	bei u_{lin} (cm/sec)	Porosität	Permeabilität, K, (cm^2) $\cdot 10^{-8}$
25.2.74/I	50 . 0,2	Kieselgel 60	0,56						
"	"	Merck, 40-63 µm	0,57						
"	"	"	0,55						
"	"	"	0,56	NB (5,45)	Isooctan-Äther, 99+1	1,4	1	0,68	
"	"	"	0,565						
27.2.74/I	50 . 0,4	"	0,55						
19.6.74/I	50 . 0,2	Merckosorb	0,57						
" II	"	SI 60, 30 µm	0,59						
24.10.74/I	50 . 0,2	Vydac RP	1,55	Tol (2,5)	40 % MeOH 60°C	0,91	1,39	0,38	1,42
" II	"	"	1,61						
7.7.75/I	50 . 0,4	Kieselgel 60	0,55						
" II	"	Merck, 40-63 µm	0,55						
8.2.75/I	50 . 0,2	Vydac SI	1,57	NB (1,7)	Hexan	0,8	1,0	0,4	1,38
" II	"	"	1,57						
10.4.77/I	40 . 0,45	Kieselgel 60		DNB (1,0)	Heptan-CH_2Cl_2-MeOH 80+20+0,03	1,29	0,42		
" II	"	Merck, 40-63 µm		"		0,87	0,47		
" III	"	"		"		0,89	0,45		0,65

a) NB = Nitrobenzol, Tol = Toluol, DNB = 1,3-Dinitrobenzol
b) MeOH = Methanol, Säule bei Raumtemperatur, wenn nichts anderes angegeben.
EtOH = Äthanol

Tabelle 7-1 (1. Fortsetzung)

b) naß gefüllte Säulen

Säulen-Nr.	Länge + i.D. (cm) der Säule	Säulenfüllmaterial	Suspendiermittel (Dichte der Suspension, g/ml)	Testsubstanz[a] (k'-Wert)	Fm und Säulentemperatur[b]	theoretische Bodenhöhe, H, (mm)	bei u_{lin} (cm/sec)	Porosität	Permeabilität, K, (cm^2) $\cdot 10^{-10}$
9.2.75/I	25 . 0,3	LiChrosorb SI 60, 5 µm	(1,9)	NB (1,0)	Hexan + 0,15% MeOH	0,053	0,33		2,73
" II	"	"	"	"		0,082	0,65		2,70
3.4.75	"	LiChrosorb RP-8, 10 µm	(1,85)	NB (6,3)	40 % MeOH	0,067	0,63	0,75	10,2
8.5.75	10 . 0,3	LiChrosorb SI 60, 5 µm	CCl_4-Dioxan 9 + 1	NB (8,5)	Hexan	0,051	1,0	0,74	3,8
8.5.75	25 . 0,3	LiChrosorb RP-8, 10 µm	(1,85)	NB (4,2)	40 % MeOH 50° C	0,60	0,29		8,7
8.7.75	"	"	Cyclohexanol $\eta(40°C) = 40$ cP	NB (1,0)	70 % MeOH 50° C	2,2	0,35		5,3
23.7.75/I	"	"	CCl_4 (1,6)	NB (2,4)	50 % MeOH	0,218	0,58	0,81	10,0
" II	"	"	"	"	"	0,156	"	"	10,0
" III	"	"	"	"	"	0,156	"	"	10,5
" IV	"	"	"	"	"	0,167	"	"	10,0
30.7.75/I	20 . 0,45	"	"						
" II	"	"	"	NB (2,45)	"	0,22	0,42	0,74	

Tabelle 7-1: (2. Fortsetzung)

Säulen-Nr.	Länge + i.D. (cm) der Säule	Säulenfüllmaterial	Suspendiermittel (Dichte der Suspension, g/ml)	Testsubstanz[a] (k'-Wert)	Fm und Säulentemperatur[b]	theoretische Bodenhöhe, H, (mm)	bei u_{lin} (cm/sec)	Porosität	Permeabilität, K, (cm) $\cdot 10^{-10}$
1.3.76/V	25 . 0,3	LiChrosorb	CCl_4 (1,6)	NB (2,50)	50 % MeOH	0,25	0,61	0,77	16,0
" VI	"	RP-8, 10 µm	"	"	"	0,15	0,61	0,77	16,0
" VII	25 . 0,4	"	"	"	"	0,16	0,71	0,74	16,5
2.5.76/VIII	25 . 0,3	"	C_2H_5I (1,95)	"	"	0,19	0,29	0,80	9,3
" IX	"	"	"	"	"	0,19	0,29	0,80	11,9
14.8.76/I	15 . 0,3	LiChrosorb	CCl_4 + EtOH	NB (1,0)	Hexan +	0,11	0,31	0,755	18,2
" II	"	SI 60, 10 µm	19 + 1	"	0,075 %	0,12	0,31	0,755	18,0
" III	25 . 0,3	"	"	"	MeOH	0,12	0,30	0,787	19,3
" IV	"	"	"	"	"	0,15	0,30	0,787	17,7
22.3.77/I	10 . 0,3	LiChrosorb	Aceton	NB (1,7)	"	0,054	0,28	0,84	5,6
" II	15 . 0,3	SI 60, 5 µm	"	"	"	0,065	0,29	0,82	5,4
" III	25 . 0,3	"	"	"	"	0,033	0,30	0,79	5,6
3.12.77/I	25 . 0,3	LiChrosorb	Dioxan	NB (1,7)	Hexan mit	0,058	0,6	0,78	6,o
" II	"	SI 60, 7 µm,	"	"	1 % Dioxan	0,062	0,6	0,78	6,5
" III	"	(nicht sedimentiert)	"	"	"	0,050	0,6	0,78	6,5
7.12.77/I	"	LiChrosorb	MeOH	NB (1,7)	"	0,049	0,3	0,79	2,9
" II	"	SI 60, 5 µm/II	"	"	"	0,026	0,3	0,80	2,9
" III	"	LiChrosorb	Dioxan	"	"	0,049	0,3	0,77	5,9
" IV	"	SI 60, 5 µm/I	"	"	"	0,036	0,3	0,81	6,3

Praktisch keine Probleme ergaben sich beim Trockenfüllen von 30 - 44 µm großen, sphärischen Dünnschichtteilchen oder von 40 - 63 µm großen, unregelmäßig geformtem Kieselgel. Das Säulenfüllmaterial wurde in kleinen Portionen eingefüllt und durch kräftiges Aufstoßen und ebenso häufiges seitliches Klopfen der Säule unter Drehen möglichst dicht gepackt. Das Trockenfüllen einer Säule nahm etwa 30 bis 60 min in Anspruch. Bei Säulen, bei denen die eingestellte Aktivität des Säulenfüllmaterials nicht verändert werden sollte, wurde das Trägermaterial möglichst wenig der Raumluft ausgesetzt und auf einmal in die Säule gefüllt und wie oben verdichtet. Damit wird u. U. eine geringere Trennstufenzahl der Säule erhalten als beim portionsweisen Einfüllen, doch wirkt sich dies bei den zum Einstellen des Wassergehaltes der Fm verwendeten Vorsäulen allenfalls so aus, daß die Kapazität der Vorsäule früher erschöpft ist.

Die Apparatur zum Naßfüllen der Säulen bestand aus:

- der Doppelkopfmembranpumpe des LC hp 1010 A (s.o.), die nach dem Dämpfungssystem einen Gegendruck von max. 250 bar zuläßt, und
- einem rostfreiem Stahlzylinder mit einem i.D. von 1,5 cm und einem Leervolumen von 38 ml. Der Ausgang zur zu füllenden Säule lag unten. Sollte die Säule aufwärts gefüllt werden, wurde ein U-Rohr verwendet. Vor der zu füllenden Säule befand sich eine Zwischensäule mit gleichem inneren Durchmesser - allerdings hatte das 1/4" - 1/4" -Zwischenstück mit 4,5 mm zum Teil einen größeren Durchmesser.

Entsprechend der Entwicklung der Säulenfüllmethoden kamen beim Naßfüllen die verschiedensten Suspendiermittel zur Anwendung. Anfangs wurde das Sorbens in Lm-Gemischen gleicher Dichte aufgeschwämmt. Damit werden zwar stabile Suspensionen erhalten, doch haben die verwendeten spezifisch schwereren Halogenkohlenwasserstoffe (Tetrabromäthan, Diiodmethan o. a.) die Eigenschaft, stark schleimhautreizend zu sein und Kopfschmerzen zu verursachen. Später wurde daher, besonders beim Aufwärtsfüllen, je nach Korngröße und Benetzbarkeit des Trägermaterials mit Tetrachlorkohlenstoff, Methanol, Äthanol, Aceton, Dioxan oder Gemischen aus den-

selben gearbeitet. Die Viskositätsmethode (mit Cyclohexanol) wurde nur ein einziges Mal angewandt. Dabei ergab sich eine Säulenfüllzeit von etwa 7 h, da einmal die Suspension < 10 proz. war und die bereits gepackten Teile der Säule nicht im Wasserbad erwärmt wurden, um die Viskosität des Lm zu senken (Tab. 7-1). Das Säulenfüllmaterial wurde in der Regel wie bei der fraktionierten Sedimentation unter Zuhilfenahme von Ultraschall (< 30 sec) im Lösemittel verteilt.

Für allgemeine Aussagen über die verschiedenen Säulenfüllmethoden ist die Zahl der jeweils gefüllten Säulen nicht ausreichend. Auch wurden meist mehrere Parameter, wie Dichte der Suspension, Konzentration u.s.w. gleichzeitig verändert. Offenbar ist jedoch bei Korngrößen ≤ 10 µm die Dichte des Suspendiermittels weniger entscheidend als z.B. die während des Füllvorganges erreichte lineare Fließgeschwindigkeit und damit die zu füllende Säulenlänge und der maximal erreichbare Vordruck. Besonders wichtig erscheint auch die Einheitlichkeit der Korngrößenfraktion. Dies zeigte sich z.B. bei den zuletzt gefüllten Säulen (Tab. 7-1: 7.12.77), bei denen ein größerer Anteil (ca. 20 %) der feinen Partikel verworfen wurde. Der Rest war in zwei etwa gleich große Portionen durch Sedimentation getrennt worden. Die damit gefüllten Säulen zeigten nicht nur eine bessere Permeabilität und kleinere Trennstufenhöhen sondern auch eine bessere Peaksymmetrie.

Das im Vergleich mit der Literatur häufig schlechtere Abschneiden der selbstgepackten Säulen wurde daher vorwiegend auf eine geringere Homogenität der verwendeten Säulenfüllmaterialien zurückgeführt. Aber auch ein ungünstiger Einfluß der Totvolumen vor und nach der Säule, der Größe der Detektorzellen und der Detektor- und Schreiber-Zeitkonstanten sind, besonders bei den 10 und 15 cm langen Säulen mit 3 mm i.D. zu diskutieren. Schließlich wird in der Literatur noch der Einfluß des Säulendurchmessers und der Rauhigkeit der Säuleninnenwand auf die Effizienz der Säulenpackungen hervorgehoben.

Test der Säulen

Vor und während der Benutzung wurden die Trennstufenhöhe, die Peaksymmetrie und die Permeabilität der gefüllten Trennsäulen bestimmt. Tab. 7-1 zeigt die Testergebnisse einiger, auch der mißlungenen oder in der Arbeit nicht verwendeten Säulen. Damit soll ein Bild von den mit den vorhandenen Mitteln und der eigenen Erfahrung erreichbaren Säulenqualitäten und deren Wiederholbarkeit gegeben werden. Daneben sind in Tab. 7-1 die Säulenfüllmethode, die Testsubstanz, ihr k'-Wert und die Trennbedingungen, die Porosität und bei einigen trocken gefüllten Säulen auch die Packungsdichte angegeben.

Bei der Säulenfüllmethode wurde meist nur das Suspendiermittel, bei Gemischen aus spezifisch schwereren und spezifisch leichteren Lösemitteln teilweise auch nur die Dichte angegeben. Bei den trocken gefüllten Säulen wurde die Packungsdichte mitgeteilt. Sie ist abhängig von der Einheitlichkeit der Korngrößenfraktion und erlaubt erst Aussagen über die Packungsqualität, wenn der Wassergehalt des Sorbens berücksichtigt wird.

Als Testsubstanz wurde häufig Nitrobenzol verwendet. Es ist leicht zugänglich und wird auch von anderen Autoren, besonders in der Chromatographie auf polaren stationären Phasen, benutzt. Die Substanz besitzt einen genügend großen ε-Wert (9600 bei 259 nm in Äthanol), so daß vorausgesetzt werden kann, daß das Lambert-Beersche Gesetz erfüllt ist. Auch wird angenommen, daß die Testsubstanz weder in normalen noch in reversed-phase Systemen bei den verwendeten linearen Geschwindigkeiten Störungen des Massentransports erfährt, wie dies bei großen und/oder schwer löslichen Molekülen oder bei polymer gebundenen stationären Phasen der Fall sein kann. Die Testsubstanzen wurden möglichst bei $k' > 1$ eluiert, um die Peakbreiten genauer messen zu können und um auszuschließen, daß RI-Änderungen des Fm durch das bei $k' = 0$ eluierte Proben-Lösemittel die UV-Detektion verfälschen.

Die k'-Werte sind in der Tabelle mitangegeben, da die Trennstufenhöhe vom k'-Wert abhängig sein kann. Sie müssen jedoch nicht richtig sein, da für die Tests die Säulen nicht ausreichend konditioniert wurden.

Die Trennstufenhöhen wurden aus den bei UV-Detektion mit entsprechend großen Papiergeschwindigkeiten erhaltenen Chromatogrammen ermittelt. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung $H = \frac{L}{5,54} \left(\frac{b_{0,5}}{t_{m+s}}\right)^2$. Die hierbei am wenigsten genau zu messende Größe ist die Peakbreite in halber Höhe, $b_{0,5}$. Sie wurde mit Hilfe einer Meßlupe (8 x) bestimmt. Die Angabe der linearen Fließgeschwindigkeit ist notwendig, da die Bodenhöhen auch bei feinem Korn von jener abhängig sind. Die bei anderen Fließgeschwindigkeiten ermittelten Trennstufenhöhen wurden nicht mitangegeben. Bei gut gepackten Säulen ergaben sich H/u-Kurven mit ähnlichen Steigungen wie in der Literatur; nur bei schlecht gepackten Säulen wurde häufig keine Abnahme der Trennstufenhöhe mit kleiner werdendem u_{lin} gefunden.

Teilweise wurden auch Peaks beobachtet, die zwar in halber Höhe schmal doch zur Basis hin infolge Tailing oder Fronting unverhältnismäßig breit waren. Ein quantitatives Maß für derartige Peaks liefert der Assymetriefaktor, der Quotient aus: Abstand des Lotes zur absteigenden Peakflanke/Abstand des Lotes zur aufsteigenden Peakflanke. Beide Abstände werden meist in 10 % der Peakhöhe gemessen. Der Assymetriefaktor wurde in der Regel geschätzt und Säulen mit einem Faktor > 2 wurden verworfen.

Die Säulenpermeabilitäten waren für die mit der gleichen Suspension gefüllte Säulen ähnlich aber unterschiedlich für an verschiedenen Tagen gefüllte Säulen. Sie können ein Maß für die Dichte der Säulenpackung sein, werden jedoch entscheidender durch die mittlere Korngröße des Säulenfüllmaterials bzw. durch den Anteil beeinflußt, der bei der vorausgegangenen Sedimentation verworfen wurde. Die Permeabilität wurde nach der folgenden Formel berechnet: $K = \frac{u_{lin} \cdot L \cdot \eta}{\Delta p} \cdot cm^2$.

Die Porosität ist der Quotient aus dem Volumen der mobilen Phase zum Leervolumen der Säule und errechnet sich aus t_m, der Durchflußrate und dem Leervolumen der Säule. Sie könnte ebenfalls ein Maß für die Packungsdichte sein, wird aber stärker durch den Belegungsgrad und das Porenvolumen der stationären Phase, durch die Totvolumina außerhalb der Säule und bei einseitig weniger durchlässigen (mißlungenen) Säulenpackungen durch die Qualität des Säulenbettes beeinflußt. Der Einfluß der Totvolumina vor und nach der Säulenpackung auf die berechneten Porositäten bei unterschiedlicher Säulenlänge zeigt sich z.B. in Tab. 7-1: 22.3.77/I-III.

Die angegebenen Porositäten, Packungsdichten, linearen Fließgeschwindigkeiten, Permeabilitäten u.a. sind schließlich insofern fehlerhaft, als die Leervolumen der Säulen selten gemessen, sondern nur aus den Säulendimensionen berechnet wurden, d.h., es wurde angenommen, daß die Säulen über die gesamte Säulenlänge den bezeichneten Innendurchmesser aufweisen. Auch das von den Fritten in den Säulenenden beanspruchte Volumen wurde nicht berücksichtigt.

Lebensdauer der Säulen

Bei den trocken gefüllten Säulen mit Dünnschichtteilchen (Vydac, 30 - 44 µm) wurde keine Abnahme der Säuleneffizienz beobachtet. Auch Hinweise auf ein Ablösen der porösen Außenschicht vom Glaskörper ergaben sich nicht. Allerdings waren jene Säulen nur kurze Zeit in Betrieb.

Von den naß gefüllten Säulen mit gebrochenem Korn, $\leq$ 10 µm, blieb keine über den gesamten Zeitraum der Arbeit erhalten. Meist äußerte sich das Ende einer Säule durch Abnahme der Trennstufenzahl unter Zunahme des Peaktailings und z.T. auch des Widerstandes. Zuweilen war es möglich, durch Ergänzen oder Erneuern des Trägermaterials am Säulenanfang die Trenneigenschaften wiederherzustellen.

Gründe für die geringe Haltbarkeit der Trennsäulen können nicht mit Sicherheit gegeben werden. Bei LiChrosorb RP-8 wäre ein chemischer Abbau der stationären Phase und eine gewisse Löslichkeit der Kieselgels - besonders bei erhöhter Säulentemperatur in dem aus Wasser un Methanol bestehenden Fm als Ursache zu nennen. Bei nicht modifiziertem Kieselgel wird eine wenn auch geringere Löslichkeit in den unpolaren Fm und eine Alterung des Kieselgels diskutiert. Die Hauptursache für die beschränkte Lebensdauer der LC-Säulen dürfte jedoch in einer sich ändernden Pakkungssymmetrie liegen. Hierbei könnte die Packung z.B. von Anfang an instabil sein, was aber erst nach plötzlichen Druck- oder Durchflußänderungen, nach Wechsel der Viskosität oder der Dichte des Fm oder nach Eintrocknen der Säule zum Vorschein kommen kann. Die Stabilität des Säulenbettes ist u.a. abhängig von der erzielten Packungsdichte und damit auch vom max. Vordruck beim Säulenfüllen. Jener war in Abhängigkeit von der Länge der zu füllenden Säule und der Viskosität der Suspension nur $\leq$ 250 bar (d.h. auch, die empirische Regel, die Säule nur bei max. der Hälfte des Säulenfülldruckes zu benutzen, konnte häufig nicht befolgt werden). Wichtiger für die Stabilität des Säulenbettes erscheint jedoch die Einheitlichkeit der Korngrößenfraktion oder besser die Abwesenheit von Teilchen, die aufgrund ihrer geringeren Größe in der Säule zu wandern vermögen.

Schließlich können nicht gelöste Teilchen mit der Probenlösung oder mit dem Fm auf die Säule gebracht werden, dort festgehalten werden und die Packungssymmetrie verändern. Bei den kleinen Probenvolumen der ätherischen Öllösungen schien eine Entfernung von suspendierten Teilchen, z.B. durch Membranfiltration nicht erforderlich. Wichtiger wäre die Filtration der vergleichsweise großen Fm-Mengen gewesen, besonders wenn eine der Fm-Komponenten zuvor durch Filtration über aktivierte Sorbenzien gereinigt worden war.

Zur Richtigkeit der k'-Werte (der Tab. 4-7, 4-9 und 4-10)

Die k'-Werte sind - vorausgesetzt, daß die Säule ausreichend konditioniert wurde und das Trennsystem nicht überladen ist - von der Richtigkeit der Retentionszeitmessung abhängig, wobei bereits geringe Fehler der Totzeit, t_m, zu relativ großen Fehlern bei den k'-Werten führen, da jene Größe in der folgenden Gleichung auch im Nenner steht. $k' = \frac{t_{m+s} - t_m}{t_m}$

D.h., je mehr die gefundene t_m von der wahren t_m nach oben abweicht, desto kleiner werden die gefundenen k'-Werte, wobei der relative Fehler bei Substanzen mit kleinen k'-Werten größer ist als bei Substanzen mit großen k'-Werten.

Zur Bestimmung der Totzeit wurde ein möglichst kleines Volumen (1 µl), einer nicht zurückgehaltenen Komponente auf die Säule gegeben: Wasser in der RP-Chromatographie bzw. ein nicht mit der Hauptkomponente des Fm identischer Kohlenwasserstoff in der Chromatographie auf polarer stationärer Phase, z.B. Heptan.

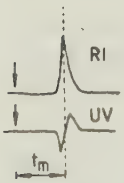


Abb. 7-2: Form der Totzeitpeaks bei RI- und bei UV-Detektion

Bei RI-Detektion wurde die Retentionszeit im Peakmaximum gemessen; bei UV-Detektion wurde der Wendepunkt zwischen dem aus einem negativen und einem positiven Peak bestehenden Lm-Signal der nicht UV-absorbierenden Komponente verwendet (= der Schnittpunkt durch die Chromatogramm-Grundlinie; s. Abb. 7-2). Dieser Punkt hatte dieselbe Retentionszeit wie das Maximum des RI-Peaks, wenn man die Verzögerung durch das größere Totvolumen vor der RI-Zelle berücksichtigt. Sämtlichte t_{m+s} und t_m-Werte, die mittels RI-Detektion erhalten wurden, waren um diesen Betrag korrigiert worden, so daß bei UV- und RI-Detektion einer Substanz übereinstimmende k'-Werte gefunden wurden.

Unberücksichtigt blieb das Totvolumen zwischen dem Ende der Säulenpackung und der UV-Zelle; d.h., die auf 10 und 25 cm langen Säulen mit 0,3 cm i.D. erhaltenen k'-Werte müssen nicht übereinstimmen, da der relative Anteil des Leervolumens nach der Säule am Gesamttotvolumen unterschiedlich groß sein kann.

Auch die Packungsdichte und die Korngröße können einen Einfluß auf die k'-Werte haben. Von der Packungsdichte ist nicht nur das Totvolumen der Säule, sondern auch das Verhältnis der stationären zur mobilen Phase abhängig. Beide beeinflussen die k'-Werte: Je dichter die Packung, desto größer die k'-Werte. Mit kleiner werdender Korngröße müßten die k'-Werte ebenfalls zunehmen, da mit dem Zerkleinerungsgrad die Oberfläche des Sorbens größer wird. Andrerseits dürften aber Säulen mit feinerem Korn geringere Packungsdichten besitzen als Säulen mit grobem Korn.

Die genauesten und richtigsten k'-Werte wären also mit möglichst langen und nicht zu dünnen, dicht gepackten Säulen zu erwarten. Zugunsten der Konditionierungs- und Analysenzeiten wurden jedoch die k'-Werte für Tab. 4-7 nur auf einer 25 cm und für die Tab. 4-9 und 4-10 auf 10 cm langen Säulen ermittelt; d.h., die gefunden k'-Werte könnten zu klein sein. Die relativen Retentionen werden dadurch aber praktisch nicht beeinflußt.

Die Fm wurden zur Ermittlung der k'-Werte stets auf der Niederdruckseite gemischt,
- um störungsfrei mit dem RI-Detektor arbeiten zu können und
- um Schwankungen der Fm-Stärke, die mit Druckänderungen durch das Öffnen und Schließen der Schleuse verbunden sein können und die vor allem zu Fehlern bei den kleinen k'-Werten führen, zu vermeiden.

Die dioxanhaltigen Fm (Tab. 4-9) wurden mit Hilfe von trocken gefüllten Vorsäulen bekannter Aktivität auf einen definierten Wassergehalt eingestellt. Für die Tab. 4-10 wurde mit trockenen Petroläther-Methanol-Gemischen gearbeitet. Zuvor war die Säule

durch längeres Durchspülen mit Methanol möglichst von Wasser befreit worden. Die k'-Werte wurden beginnend mit dem methanolreichsten Fm gemessen.

Das Verhältnis der Probenmenge zur Menge an Säulenfüllmaterial lag zwischen 1 : 10^4 bis 1 : 10^5, so daß fehlerhafte k'-Werte infolge Überladung des Systems unwahrscheinlich sind. Um die relative Retention nahe beeinander liegender Stoffe durch nicht gänzlich auszuschließende Änderungen der Trennbedingungen möglichst wenig zu beeinflussen, wurden die Substanzlösungen in etwa geordnet nach steigender Retention auf die Säule gegeben.

Auch bei gut UV-absorbierenden Verbindungen wurde stets mit UV- und RI-Detektion gearbeitet, denn ähnlich wie in der DC war es nur durch unspezifische Detektion möglich, die Hauptkomponenten in den häufig sehr unreinen Vergleichsstoffen zu finden. Bei Vergleichsstoffen, die mehrere ähnlich große RI-Peaks ergaben, war es teilweise möglich, aufgrund der Struktur der Verbindung den Peak mit der richtigen Retentionszeit herauszufinden, z.B. bei Citronellal, das eine große Menge eines Alkohols, vermutlich Isopulegol, enthielt. Bei einigen Stoffen mußte die Zuordnung unsicher bleiben, so z.B. bei Δ^3-Caren, das auf unpolarer stationärer Phase in 3 zu etwa gleichen Mengen vorkommende Monoterpen-Kohlenwasserstoffe aufgetrennt wurde.

In den meisten Fällen wurden die k'-Werte der Tabellen 4-7, 4-9 und 4-10 aus nur einem t_{m+s}-Wert errechnet. Teilweise wurde auch die zweite Stelle nach dem Komma angegeben, auch wenn dies nicht der Genauigkeit der Methode entspricht. Es geschah, um Unterschiede in der Selektivität nahe beeinander eluierter Substanzen nicht durch Auf- oder Abrunden zu verwischen oder zu vergrößern. Bei k'-Werten größer 10 dürfte auch die erste Stelle nach dem Komma bei so kurzen Säulen nicht ganz sicher sein. Ebenfalls nicht sehr genau zu messen sind k'-Werte < 1. Bei den dioxanhaltigen Fm² (Tab. 4-9) kommt noch hinzu, daß die Beladbarkeit des Systems für Komponenten mit ähnlicher Retentionszeit wie Dioxan (z.B. Cineol, Menthon) ungewöhnlich gering ist.

(Dioxan zeigte auf Kieselgel mit Fm Petroläther-Dioxan 99,9 + 0,1 mit mittlerem Wassergehalt einen etwa 10 % größeren k'-Wert als Cineol.)

Zu 4.3.3.8 Einstellung der LiChrosorb SI 60-Säule auf Aktivität I und Aktivität II - III

Um die LiChrosorb SI 60-Säule, 15 cm · 0,3 cm i.D., auf Aktivität I zu bringen, wurde sie ebenso wie die Vorsäule, 25 cm · 0,45 cm i.D., gefüllt mit Kieselgel 60 Merck, 40 - 63 µm, in einem Gaschromatographen bei 130° C mit trockenem Stickstoffstrom 2 Stunden ausgeheizt. Die Verwendung einer Vorsäule erschien notwendig, da absolut wasserfreie Fm sehr schnell aus der Umgebung Wasser aufnehmen. Umgießen in ein anderes Gefäß kann bei so unpolaren Fm genügen, um die relative Wassersättigung beträchtlich zu verändern[90].

Um anschließend das aktivierte LiChrosorb SI 60 auf einen mittleren Wassergehalt einzustellen, wurde eine 90 cm · 0,45 cm lange Vorsäule, gefüllt mit Kieselgel 60 Merck, 40 - 63 µm, + 13 % (G/G) Wasser verwendet. Es waren etwa 250 Säulentotvolumen des Fm Petroläther-Dioxan, 99,5 + 0,5, zur Einstellung des neuen Wassergleichgewichtes notwendig.

Zu 4.3.4.6 Bestimmung der Beladbarkeit der Trennsysteme

Für die sich jeweils um den Faktor zwei unterscheidenden Probenkonzentrationen wurde meist nur je ein Wert ermittelt. Die Probenlösungen wurden nach steigender Konzentration auf die Säule gegeben. Das Probevolumen war stets das gleiche: 5 µl aus 5 µl Spritzen, die jeweils 10 mal mit der nächsten Probenlösung gespült wurden. Bei den größeren Probenmengen wurden dabei bis zu 50 proz. Probenlösungen auf die Säule gegeben, d.h., mit größeren Probenvolumina entsprechend dünnerer Probenlösungen würde

sich für die größeren Probenmengen u.U. eine bessere Beladbarkeit des Systems ergeben.

7.6 Verwendete ätherische Öle, synthetisierte oder bei den quantitativen Bestimmungen verwendete Vergleichssubstanzen und Reinigung der Lösemittel

Bei den 4 ätherischen Ölen (Melissen-, Mentha-, Pinus- und Eucalyptusöl) handelt es sich um Öle des Handels, die nicht näher bezeichnet waren. Sie wurden daher neben den chromatographischen Untersuchungen durch physikalische und spektroskopische Verfahren näher charakterisiert (s. 2.2).

Die anfangs voll gefüllten Flaschen wurden während der Arbeiten im Kühlschrank bei etwa 4° C aufbewahrt. Da sich die Untersuchungen über mehrere Jahre erstreckten, sind Stoffveränderungen in den Ölen nicht auszuschließen.

Die verwendeten Vergleichssubstanzen waren teilweise recht uneinheitlich. Für die qualitativen Untersuchungen wurden in der Regel die ungereinigten Stoffe verwendet, auch wenn es zuweilen schwierig war, die erhaltenen chromatographischen Zonen richtig zuzuordnen. Die Identifizierung der Peaks der ätherischen Öle erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten in verschiedenen DC-, GC- und HPLC-Systemen, in der DC außerdem durch Vergleich der UV-Remissionsspektren und in der HPLC durch Vergleich der UV-Absorptionskurven der gesammelten Fraktionen. Zur Identifizierung des Pinocarvons, das in der LC ähnlich wie Myrtenal eluiert wird und das ebenfalls in Eucalyptusölen vorkommen kann, wurde die entsprechende LC-Fraktion noch gc untersucht. Das verwendete Eucalyptusöl enthielt nur Pinocarvon. Die Identitätsbeweise schienen ausreichend, zumal das Vorkommen jener Stoffe in den entsprechenden Ölen in etwa diesen Konzentrationen in der Literatur beschrieben ist und da das Schwergewicht der Arbeit bei den quantitativen Untersuchungen lag. Auch die Einheitlichkeit der identifizierten und quantitativ bestimmten Peaks der ätherischen Öle ist von ge-

ringerem Interesse, weil die Wiederfindungsrate jener Peaks im Gemisch der Öle dadurch nicht beeinflußt wird, solange die chromatographische Selektivität unverändert bleibt.

Für die quantitativen Arbeiten konnten dagegen nur wenige Vergleichssubstanzen ohne weitere Reinigung verwendet werden. Die im folgenden beschriebenen Reinigungsschritte mögen nicht immer optimal sein, doch stand teilweise nicht genügend Substanz zur Verfügung, z.B. für Destillationen über effektivere Kolonnen aber mit größerem Rückhaltevolumen. Präparative LC wurde nur in einem Fall versucht und schien für Stoffmengen > 1 g, wie sie für mehrere genaue Einwaagen leicht flüchtiger Stoffe notwendig sind, vergleichsweise teuer.

1,8-Cineol (Eucalyptolum puriss. DAB 6, 176 - 177° C, Merck 3175) farblose Flüssigkeit, hatte nach einfacher Destillation einen GC-Gehalt von 99,6 %.

Citral, Dragoco, eine schwach gelbe Flüssigkeit mit einem gefundenen GC-Gehalt von 98 % wurde über eine 10 cm Vigreux-Kolonne destilliert. Der weniger angenehm riechende Vorlauf und der gelbbraune ölige Rückstand wurden verworfen. Die gesammelte, farblose Fraktion (Sdp_2 69 - 73° C) hatte einen Gehalt von 99,5 % (GC). Das Verhältnis Neral : Geranial betrug 37 : 63.
ε = 14400 bei 236 nm in Methanol.

n-Dodecanol-1, Roth, > 99 %, erwies sich bei den gewählten GC-Bedingungen als einheitlich (100 %).

Geraniol, Dragoco, eine schwach gelbe Flüssigkeit, mit einem GC-Gehalt von 98,7 %, wurde über eine 10 cm Vigreux-Kolonne destilliert. Nur wenig Vorlauf und der gelbbraune ölige Rückstand wurden verworfen. Der GC-Gehalt des farblosen Destillats (Sdp_1 74 - 75° C) war unverändert.

(-)-Menthol, Dragoco, recrist., puriss. DAB 6, für das ein GC-Gehalt von 99,4 % gefunden worden war, wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

(-)-Menthylacetat wurde aus (-)-Menthol und Acetanhydrid durch alkalische Katalyse mit Pyridin erhalten[193]. Das nach Vakuumdestillation erhaltene Produkt (Sdp_{14} 108° C) enthielt neben 80 % Menthylacetat noch etwa 20 % Menthol, welches für die qualitativen Untersuchungen nicht abgetrennt wurde.

Phthalsäuredi-n-butylester, Fluka, puriss., p.a., 99,5 % (GC), wurde ohne weitere Reinigung verwendet. ε = 8950 bei 221 nm in Heptan.

Pinocarveol: Nach M. Lloyd[194] wurden 0,3 Mol β-Pinen und 0,15 Mol SeO_2 in Aethanol langsam gemischt, 4 h am Rückfluß erhitzt und anschließend das entstandene Pinocarveol durch Wasserdampf- und Vakuumsdestillation (Sdp_{11} 90° C) abgetrennt. n_D^{20} = 1,4983. Aufgrund der DC enthält das Destillat noch geringe Mengen anderer Alkohole und sehr wenig C = O-Verbindungen.

Pinocarvon: Nach D. Stallcup[195] wurden 0,3 Mol β-Pinen und 0,3 Mol SeO_2 in Aethanol langsam gemischt, 10 h am Rückfluß destilliert und anschließend die flüchtigen Anteile durch Wasserdampf- und Vakuumdestillation (Sdp_1 44 - 45° C) abgetrennt. Das Destillat enthielt neben Pinocarvon etwa 30 % Myrtenal und 5 % andere Verunreinigungen (GC). Über die Sulfit-Addukte wurde versucht, die beiden Hauptkomponenten zu trennen. Dabei verringerte sich neben der Menge an flüchtigen Terpenen auch das Verhältnis Pinocarvon : Myrtenal; Pinocarvon schien sich bei diesem chemischen Reinigungsschritt bevorzugt zu zersetzen. Bei der anschließenden Aufbewahrung im Eisfach des Kühlschranks (< 0° C) bildeten sich bald unlösliche Polymerisationsprodukte, wodurch der Anteil an Pinocarvon weiter abnahm. Auf die Bestimmung der Stoffeigenschaften und des Gehalts im Eucalyptusöl wurde daher verzichtet.

Piperiton, Riedel de Haen, eine goldgelbe Flüssigkeit, hatte einen Gehalt von 92 % (GC). Durch mehrmalige Destillation über eine 20 cm Vigreux-Kolonne konnte eine farblose Fraktion mit 97 % (GC) Piperton erhalten werden. Zur weiteren Reinigung wurde im gleichen Volumen Petroläther 30/50° C unter Verwendung

von CO_2/Aceton als Kältemittel einmal umkristallisiert. Nach einfacher Vakuumdestillation (Sdp_1 70 - 80° C) des auskristallisierten Anteils wurde ein Gehalt von 99,1 % (GC) ermittelt. ε = 13200 bei 232 nm in Methanol.

Pulegon, Ega-Chemie, eine schwach gelbe Flüssigkeit, hatte einen GC-Gehalt von 90 %. Durch wiederholte Destillation über eine 20 cm Vigreux-Kolonne konnte eine Fraktion mit 97 % (GC) erhalten werden. Sdp_{13} 100,5° C, farblose Flüssigkeit. ε = 7400 bei 251 nm in Methanol.

Verwendete Lösemittel und ihre Reinigung[196-199)]

Die in der LC verwendeten Lm sollten für analytische Zwecke besonders folgende Reinheitskriterien erfüllen:

- frei von Verunreinigungen mit größerer Elutionskraft, die bei isokratischen Bedingungen die Retentionswerte und u.U. die Selektivität des Trennsystems beeinflussen. Bei Gradientenelution werden Verunreinigungen der schwächeren Fm-Komponente als zusätzliche Peaks eluiert, deren Größe von der Menge des vor Beginn des Gradienten durchgespülten Fm-Volumens abhängig ist. Zu ihrer Entfernung eignen sich neben chemischen Methoden besonders die Filtration über Sorbenzien mit entsprechendem Retentionsvermögen. Geringe Mengen unpolarer Verunreinigungen haben praktisch keinen Einfluß auf die k'-Werte, z.B. das zur Stabilisierung von Chloroform verwendete Penten.
- frei von suspendierten Partikeln, die die Funktion und Genauigkeit der Pumpen und die Packungsqualität der HPLC-Säulen beeinträchtigen. Zu ihrer Entfernung eignet sich die Membranfiltration, die jedoch bei diesen Arbeiten nicht mehr eingesetzt wurde.
- frei von UV-absorbierenden Verunreinigungen, die den linearen Bereich des UV-Detektors verringern. Zur Reinigung eignen sich, je nach Art der störenden Verunreinigung physikalische oder chemische Methoden.

In der GC wie auch in der präparativen LC sollten die Lm frei von schwerer flüchtigen Verbindungen sein, wofür in der Regel die Destillation über eine 50 cm Raschig-Kolonne ausreichend ist.

Di-n-butyläther (Merck, Art. 2892) wurde über basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert. Zur Wassersättigung schien für die DC 30 min Rühren mit wenig Wasser ausreichend.

Dichloräthan wurde über Kieselgel 60, Akt. I, oder neutrales Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert. Zur Wassersättigung schien für die DC 30 min Rühren mit wenig Wasser ausreichend.

Di-isopropyläther (Merck z. Synth., Art. 800866) wurde über basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert.

Dioxan wurde fraktioniert destilliert, 3 h mit konz. Salzsäure am Rückfluß gekocht und über basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert.

300	280	260	240	230	220	210 nm
100	94	70	52	42	20	2 %T

Da Dioxan den Fm nur in geringer Menge zugemischt wurde, störte eine geringere UV-Durchlässigkeit desselben weniger als z.B. Spuren von Wasser, welche die k'-Werte und die Selektivität beeinflussen, falls der Wassergehalt des Fm nicht durch Vorsäulen kontrolliert wird.

Heptan (Merck, Art. 5365) enthielt wechselnde Mengen Toluol und wurde wie Petroläther (s.u.) gereinigt.

260	250	240	230	220	210	200 nm
100	99	97	93	76	69	24 %T

Methanol, BASF, wurde über 50 cm Raschigringe fraktioniert destilliert und dadurch auch von Wasser befreit. Je nach UV-Durchlässigkeit des Ausgangsmaterials war ein- oder zweimalige fraktionierte Destillation ausreichend. Später wurde auch über 50 cm

Maschendrahtringe, 2 x 2 mm, destilliert.

250	240	230	220	210	200 nm
100	97	87	69	44	5 %T

Petroläther, 50 - 70° C enthielt als am schwierigsten zu entfernende Verunreinigung Benzol (< 1 %), welches bis 280 nm UV-durchlässig ist. Durch Destillation über 50 cm Raschig- oder effektivere Kolonnen konnte es nur teilweise abgetrennt werden, da es mit Kohlenwasserstoffen Azeotrope bildet. Die Filtration über aktivierte Sorbenzien (k' von Benzol in Petroläther auf getrocknetem Kieselgel 60, Merck, = 3,1) erschien vergleichsweise teuer und nur für kleine Mengen geeignet.

Mit dem folgenden Verfahren wurden Benzol vollständig und ungesättigte Kohlenwasserstoffe teilweise entfernt: Nach Kolonnendestillation wurde wiederholt > 12 h mit Schwefelsäure, Schwefelsäure mit 10 % SO_3 gerührt, 2 mal kräftig mit Wasser ausgeschüttelt (um entstandenes SO_2 zu entfernen), 24 h über KOH getrocknet und erneut über eine 50 cm Raschigkolonne destilliert.

260	250	240	230	220	210	200 nm
100	99	97	90	77	54	28 %T

Es sei erwähnt, daß mit n-Hexan etwas bessere UV-Durchlässigkeiten erreicht werden, zumal die verwendete Petroläther-Fraktion nur wenig n-Hexan enthielt (Sdp 50 - 65° C).

Rückgewinnung des UV-reinen Petroläthers aus Fm², die sauerstoffhaltige polare Fm-Komponenten und höhersiedende Probenbestandteile enthielten: Nach Ausschütteln mit Wasser (2 mal), Destillation am Rotationsverdampfer, Ausschütteln mit 50 Vol. % Schwefelsäure (1 mal), Rühren über konz. Schwefelsäure (12 h, u.U. mehrmals) und Ausschütteln mit Wasser (2 mal) wurde über basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert und über eine 50 cm Raschig-Kolonne destilliert. Verglichen mit der Erstreinigung ist die Rückgewinnung aus Fm-Abfällen nicht aufwendiger. Es wurde z.B. weniger Schwefelsäure verbraucht.

Toluol wurde mit konz. Schwefelsäure gerührt und über basisches Aluminiumoxid, Akt. I, filtriert. Zur Wassersättigung schien für die DC eine Stunde Rühren mit wenig Wasser ausreichend.

1,1,2,2,Tetrabromäthan (Merck, Art. 34) wurde vor dem Bereiten der Suspensionen zum Naßfüllen von HPLC-Säulen durch Filtration über Kieselgel 60, Akt. I,von polareren Verunreinigungen (Br_2, HBr) befreit.

Wasser: Es wurde bidest. Wasser oder Leitungswasser verwendet, das unter Verwerfen des Vorlaufes einmal destilliert wurde. Zur Entfernung der in der Gradientenelution auf RP-Phasen störenden unpolareren Verunreinigungen wird Filtration über silanisiertes Kieselgel empfohlen.

Für die Lm-Reinigung verwendete Sorbenzien:
Kieselgel 60, 63-200 µm (Merck, Art. 7734), das > 24 h bei 140° C im Vakuum-Trockenschrank (< 100 Torr) getrocknet worden war;
Aluminiumoxid, basisch bzw. neutral, < 200 µm, (Woelm), das bei 300° C im Trockenschrank > 24 h nachgetrocknet worden war.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1) E. Gildemeister und F. Hoffmann, Die ätherischen Öle, 4. Aufl., Band I-VIII, Akademie-Verlag, Berlin 1956-1968

2) E. Guenther, The Essential Oils, Vol. I-VI, D. van Nostrand Co. Inc., New York 1949-1952

3) J. L. Simonsen et al., The Terpenes, Vol I-V, Cambridge University Press, Cambridge 1953-1957

4) W. Karrer, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel 1958

5) D. Merkel, Riechstoffe, Akademie-Verlag, Berlin 1972

6) G. Schneider, Pharmazeutische Biologie, S. 119-165, Bibliographisches Institut, Zürich 1975

7) Dragoco (Hrsg.), Pfefferminzöle und Menthol, Holzminden 1963

8) E. Guenther et al., The Essential Oils and Related Products, Anal. Chem. 49, 83R (1977), - zweijährlich erscheinender Übersichtsartikel

9) Lit. 1, Band II, S. 199 und 229

10) J. G. Kirchner et al., Anal. Chem. 23, 428 (1951)

11) E. Stahl, Pharmazie 11, 633 (1956)

12) H. Auterhoff und K.-A. Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsges., Stuttgart 1977

13) Analytical Methods Committee, Analyst (London) 98, 616 (1973)

14) M. Vilkas und N. A. Abraham, Bull. Soc. Chim. Fr. 1959, 1961

15) J. Kallen, Helv. Chim. Acta 43, 489 (1960)

16) E. Stahl (Hrsg.), Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., S. 210, Springer Verlag, Berlin 1967

17) H. Farnow, Dragoco Rep. (Ger. Ed.) 1968 (1), 3 und (2), 27 und 1970 (8), 163

18) W. Bruhn, Dragoco Rep. (Ger. Ed.) 1974 (6), 115

19) G. Hesse, Z. Anal. Chem. 211, 5 (1965)

20) G. Hesse, Chromatographisches Praktikum, S. 213 f, Akademische Verlagsges., Frankfurt 1968

21) H. G. Cassidy, Fundamentals of Chromatography, in Weissberger et al., Techniques of Organic Chemistry, Vol. 10, S. 242 f, Interscience Publ., New York 1957

22) E. Lederer und M. Lederer, Chromatography, S. 276-279, Elsevier, Amsterdam 1964

23) R. Neher, Steroid Chromatography, 2nd Ed., S. 52 und 240, Elsevier, Amsterdam 1964

24) R. Wrolstad et al., J. Chromatogr. 18, 318 (1965)

25) G.L.K. Hunter et al., J. Org. Chem. 28, 1979 (1963)

26) K. Macek, J. Chromatogr. 33, 332-334 (1968)

27) F. Hefendehl, Arch. Pharm. 303, 345 (1970)

28) L.R. Snyder, Principles of Adsorption Chromatography, Marcel Dekker, New York 1968

29) J.J. Kirkland, Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York 1971

30) N. Hadden et al., Basic Liquid Chromatography, Varian Aerograph, Walnut Creek, California 1971

31) P.R. Brown, High Pressure Liquid Chromatography - Biochemical and Biomedical Applications, Academic Press, New York 1972

32) S.G. Perry, R. Amos and P.I. Brewer, Practical Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York 1974

33) L.R. Snyder and J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York 1974

34) J.N. Done, H.J. Knox and J. Loheac, Applications of High-Speed Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974

35) E. Gruschka (Ed.), Bonded Stationary Phases in Chromatography, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1974

36) H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer-Verlag, Berlin 1975

37) N.A. Parris, Instrumental LC - A Practical Manual on High-Performance LC-Methods, Elsevier, Amsterdam 1976

38) C.F. Simpson (Ed.), Practical High-Performance Liquid Chromatography, Heyden, London 1976

39) R.P.W. Scott, Contemporary Liquid Chromatography, Wiley, New York 1976

40) J.F. Lawrence and R.W. Frei, Chemical Derivatization in Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1976

41) H.F. Walton, Ion Exchange and Column Chromatography (biennial review), Anal. Chem. 48, 52R (1976) und
G. Zweig und J. Sherma, Paper and Thin-Layer Chromatography (biennial review), Anal. Chem. 48, 66R (1976)

42) J.C. Giddings et al. (Ed.), Advances in Chromatography, Vol. 1-15, Marcel Dekker, New York 1967-1977

43) Z. Deyl and J. Kopecky, J. Chromatogr. Suppl. Vol. No. 6 (1976), Bibliography of Liquid Column Chromatography

44) E. Knapman (Ed.), GC-Abstracts (seit 1970 auch LC-Abstracts), The Institute of Petroleum, London

45) E. Steinegger und R. Hänsel, Lehrbuch der Pharmakognosie, 2. Aufl., S. 413, Springer-Verlag, Berlin 1968

46) Lit. 1, Band VII, S. 154 (1961)

47) H.E. Ungnade, M.J. Kamlet, Organic Electronic Spectral Data, Vol. I-X, Interscience, New York 1960-1974

48) K. Yamaguchi, Spectral Data of Natural Products, Vol I, Elsevier, Amsterdam 1970

49) G. Rücker, Dtsch. Apoth. Ztg., 115, 935 (1975)

50) N.F. Goodway et al., J. Chem. Sec. 1939, 1853

51) A.I. Scott, Interpretation of UV-Spectra of Natural Products, Pergamon Press, Oxford 1964

52) Landoldt-Börnstein, 6. Auflage, Band II/8, S. 5-572ff, Springer-Verlag, Berlin 1962

53) z.B. Lit. 1, Band II, S. 31-181

54) Lit. 1, Band IIIc, S. 109

55) Lit 1, Band II, S. 126

56) R. E. Kaiser, Chromatographie in der Gasphase, Band I-IV, Bibliographisches Institut, Mannheim 1968-1977

57) E. Leibnitz und H.G. Struppe, Handbuch der Gas-Chromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1970

58) G. Schomburg, Gaschromatographie, 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1977

59) D. Jentsch, Gas-Chromatographie, 3. Aufl., Franckh, Stuttgart 1975

60) E. Bayer, Gas-Chromatographie, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1962

61) A.I.M. Keulemans und E. Cramer, Gas-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1959

62) D.W. Grant, Gas-Liquid Chromatography, Van Nostrand Reinhold Co., London 1971

63) A.B. Littlewood, Gas Chromatography, 2nd Ed., Academic Press, New York 1970

64) L.S. Ettre and A. Zlatkis (Eds.), The Practice of Gas Chromatography, Interscience, New York 1967

65) H. Pauschmann und E. Bayer, Gas-Chromatographie, in F. Korte (Hrsg.), Methodicum Chimicum I/1, S. 148, Thieme Verlag, Stuttgart 1973

66) St.P. Cram and R.S. Juvet, Gas Chromatography (biennial review) Anal. Chem. 48, 411R (1976)

67) K.H. Kubeczka, Mitt. Dtsch. Pharm. Ges. 41, 277 (1971)

68) E. v. Rudloff, Gas-Liquid Chromatography of Terpenes in Lit. 42, Vol. 10, S. 173 (1974)

69) H. Farnow, Gas-Chromatographie, Dragoco, Holzminden 1966

70) F. Sorm et al., Chromatography of Terpenes, in E. Heftmann (Ed.), Chromatography, 2 nd Ed., Nostrand Publ. Co., New York 1967

71) B.I. Gudzinowicz, Gas Chromatographic Analysis of Drugs and Pesticides, Marcel Dekker, New York 1967

72) H. Glasl und H. Wagner, Dtsch. Apoth. Ztg. 114, 146 und 363 (1974)

73) H. Thieme und R. Benecke, Zentralbl. Pharm. 115, 139 (1976)

74) Lit. 56, Band IV (1969)

75) R. Kaiser, Chromatographia 4, 123, 215, 361 und 537 (1971)

76) H.W. Johnson in Lit. 42, Vol. 5, S. 175 (1968)

77) J. Novák in Lit. 42, Vol. 11, S. 1 (1974)

78) H. Holzhäuser in Lit. 57, S. 527

79) H.S. Kroman and S.R. Bender, Theory and Applications of Gas Chromatography in Industry and Medicine, S. 61-67, Grune & Stratton, New York 1968

80) A. Shatkay and S. Flavian, Anal. Chem. 49, 2222 (1977)

81) R.L. Martin, Anal. Chem. 33, 347 (1961)

82) E. Ziegler und H. Guenther, Chromatographia 4, 524 (1971)

83) D.W. Grant and A. Clarke, J. Chromatogr. a) 92, 257 (1974), b) 97, 115 (1974)

84) H. Brandauer und E. Ziegler, Parfümerie und Kosmetik 54, 1 (1973)

85) F. Geiss, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Vieweg, Braunschweig 1972

86) F. Geiss und H. Schlitt, J. Chromatogr. 82, 5 (1973)

87) R. Perry and S.G. Amos, J. Chromatogr. 83,245 (1973)

88) G. Rouser, J. Chromatogr. Sci. 11, 60 (1973)

89) Lit. 85, S. 202

90) L.V. Berry und H. Engelhardt, J. Chromatogr. 95, 27 (1974)

91) Lit. 16, S. 202-253

92) K. Macek et al., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1961-1965, J. Chromatogr. (1968),und 1966-1969, J. Chromatogr. (1972)

93) J.A. Attaway et al., Anal. Chem. 37, 1289 (1965)

94) A.S. Gupta et al., J. Chromatogr. 12, 189 (1963)

95) R. Jaspersen-Schib, Pharm. Acta Helv. 36, 141 (1961)

96) S. Hermanek in M. Sarsanuva et al., TLC in Pharmacy and Clinical Biochemistry, 1968, zitiert in: F. Korte (Hrsg.), Methodicum Chimicum, Band I/1, S. 75, Thieme-Verlag, Stuttgart 1973

97) L. Rohrschneider, Anal. Chem. 45, 1241 (1973)

98) L.R. Snyder, J. Chromatogr. 92, 223 (1974)

99) L.R. Snyder, Anal. Chem. 46, 1384 (1974)

100) Lit. 85, S. 49f

101) E. Stahl, Angew. Chem. 73, 646 (1961)

102) A.G. Netting, J. Chromatogr. 53, 507 (1970)

103) Lit. 16, S. 228

104) E. Stahl, Dtsch. Apoth. Ztg 108, 1230 (1969)

105) E. Stahl et al., Z. Anal. Chem. 236, 294-310 (1968)

106) z.B. J.R. Rogers, Americ. Perfumer. 78, 17 (1963), zitiert in Miltitzer Berichte 1965/66, S. 229, VEB Chemische Fabrik Miltitz, Miltitz bei Leipzig 1968

107) T.J.N. Webber et al., J. Chromatogr. 122, 243 (1976)

108) R.E. Kaiser (Hrsg.), HPDC, Institut für Chromatographie, Bad Dürkheim 1976

109) J. Ripphahn et al., J. Chromatogr. 112, 81 (1975)

110) P.A. Bristow et al., J. Chromatogr. 131, 57 (1977)

111) R.V. Vivilecchia et al., J. Chromatogr. 99, 407 (1974)

112) A.F. Michaelis et al., J. Pharm. Sci. 62, 1399 (1973)

113) Lit. 29, S. 47

114) Technical Bulletin Nr. 31, Applied Science Laboratories Inc.

115) D.C. Locke, J. Chromatogr. Sci. 11, 120 (1973)

116) R.E. Leitch, J. Chromatogr. Sci. 11, 105 (1973)

117) N.K. Bebris et al., J. Chromatogr. 117, 257 (1976)

118) C.G. Horvarth et al., J. Chromatogr. 125, 129 (1976)

119) E.J. Kikta et al., Anal. Chem. 48, 1098 (1976)

120) B.L. Karger et al., J. Chromatogr. 128, 65 (1976)

121) C. Horvarth et al., Anal. Chem. 49, 142 (1977)

122) S.R. Bakalyar, J. Chromatogr. 142, 353 (1977)

123) H. Colin et al., J. Chromatogr. 141, 289 (1977)

124) J.A. Schmit et al., J. Chromatogr. Sci. 9, 645 (1971)

125) K. Karch, Dissertation Saarbrücken 1974; J. Chromatogr. 122, 3 und 171 (1976)

126) M. Riedmann, Z. Anal. Chem. 279, 154 (1976)

127) Lit. 36, S. 101

128) R.P.W. Scott in Lit. 38, S. 62 ff

129) Lit. 85, S. 249

130) F. Eisenbeiss, Chem. Ztg. 95, 237 (1971)

131) G.R. Duncan, J. Chromatogr. 8, 38 (1962)

132) B. Coq et al., J. Chromatogr. 97, 137 (1974)

133) E. Soczewinski et al., J. Chromatogr. 118, 91 (1976) und 131, 408 (1977)

134) Applied Science Laboratories, Technical Bulletin No. 30

135) z.B. K. Unger, Z. Anal. Chem. 277, 319 (1975)

136) S. Braunauer et al., J. Am. Chem. Soc. 60, 309 (1938)

137) z.B. H. Engelhardt et al. Anal. Chem. 46, 336 (1974)

138) R.J. Maggs, J. Chromatogr. Sci. 7, 145 (1969)

139) H. Barth et al., J. Chromatogr. 83, 289 (1973)

140) S.R. Bakalyar et al., J. Chromatogr. 126, 327 (1976)

141) M. Uihlein in Königsteiner-Chromatographie-Tage 1976, S.67 f Waters GmbH, 624 Königstein 1976

142) I. Halasz et al., J. Chromatogr. 142, 241 (1977)

143) M. Martin et al., J. Chromatogr. a) 99, 357 (1974), b) 108, 229 (1975) und c) 110, 213 (1975)

144) R.P.W. Scott et al., J. Chromatogr. 119, 467 (1976)

145) L. Berry et al., Anal. Chem. 45, 819A (1973)

146) H. Lorenz in Lit. 141, S. 18 ff

147) z.B. D'Ans-Lax, 3. Aufl., 1. Band, S. 802 ff, Springer-Verlag, Berlin 1967

148) R.P.W. Scott et al., J. Chromatogr. 138, 283 (1977)

149) H. Lorenz in Lit 141, S. 5 ff

150) M.T. Jackson et al., Int. Lab. 1974, 57

151) Orlita KG, 6300 Giessen

152) z.B. Lit. 52, Band II/5, S. 366

153) E. Kikta et al., J. Chromatogr. 138, 321 (1977)

154) W. Boehme et al., J. Chromatogr. 133, 67 (1977)

155) J.-P. Thomas et al., J. Chromatogr. 139, 21 (1977)

156) G. Rössler et al., J. Chromatogr. 92, 33 (1974)

157) R.P.W, Scott, J. Chromatogr. 142, 213 (1977)

158) W. Baumann in Lit. 141, S. 27 ff

159) R.P.W. Scott, Liquid Chromatography Detectors, Elsevier, Amsterdam 1977

160) M. Goedert et al., Chromatographia 6, 76 (1973)

161) H.-J. Höfert, Refraktometrie in W. Foerst, Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 3. Aufl., Band 2/1, S. 480, Urban & Schwarzenberg, München 1961

162) E. Kikta et al., J. Chromatogr. 138, 41 (1977)

163) C.K. Shu et al., J. Chromatogr. 106, 271 (1975)

164) R.A. Jones et al., J. Chromatogr. 130, 368 (1977)

165) Beckman Instruments GmbH, Frankfurter Ring 115, 8000 München 45

166) Hewlett Packard GmbH, Bernerstraße 117, 6000 Frankfurt 56

167) Micromesure AG, CH-7402 Bonaduz, Schweiz

168) Lit. 56, Band III/1 (1969) S. 117 ff

169) Johns-Manville, Ken-Caryl Ranch, Denver, CO 80217, USA

170) E. Merck, 6100 Darmstadt 1

171) Wilkens Instrument & Research Inc., Box 313, Walnut Creek, CA, USA

172) W.A. Aue et al., J. Chromatogr. 77, 229 (1973)

173) I. Smith et al., J. Chromatogr. 82, 159 (1973)

174) D. Jänchen, J. Chromatogr. 14, 261 (1964)

175) Camag, CH-4132 Muttenz, Schweiz

176) M. Woelm, 344 Eschwege

177) H. Jork in E.J. Shellard (Ed.), Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, S. 79-89, Academic Press, London 1968

178) B.P. Lisboa, J. Chromatogr. 16, 136 (1964)

179) H. Ertel et al., J. Chromatogr. 7, 268 (1962)

180) K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., S. 89, Verlag Chemie, Weinheim 1966

181) Carl Zeiss, 7082 Oberkochen

182) T. Aratani et al., J. Chromatogr. 79, 173 (1973)

183) Scientific Glass Engineering Pty. Ltd., Melbourne, Australia 3051

184) Schoeffel Instruments GmbH, Celsius-Straße, 2351 Trappenkamp

185) Laboratory Data Control, Interstate Industrial Park, Riviera Beach, Fla.33404, USA

186) Bandelin KG, Heinrichstraße 3-4, 1000 Berlin 45

187) The Separation Group, Hesperia, California 92349 - geliefert durch Macherey & Nagel, 5160 Düren

188) J. Asshauer et al., J. Chromatogr. Sci. 12, 139 (1974)

189) R,M. Cassidy et al., Anal. Chem. 46, 340 (1974)

190) I. Halasz, Z. Anal. Chem. 277, 257 (1975)

191) J.C. Kraak et al., J. Chromatogr. 122, 147 (1976)

192) H.P. Keller, Anal. Chem. 49, 1958 (1977)

193) Autorenkollektiv, Organikum, 11. Aufl., S. 445, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1972

194) M. Lloyd et al., J. Am. Chem. Soc. 64, 1008 (1942)

195) D. Stallcup et al., J. Am. Chem. Soc. 63, 3339 (1941)

196) I.A. Riddick et al., Organic Solvents, 3 rd Ed., Wiley-Interscience, New York 1970

197) M. Pestemer, Anleitung zum Messen von Absorptionsspektren im Ultraviolett und Sichtbaren, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1964

198) G. Hesse et al., Z. Anal. Chem. 241, 91 (1968)

199) W. Bunge in E. Müller (Hrsg.), Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Band I/2, S. 765, Thieme-Verlag, Stuttgart 1959

9 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN, DER SYMBOLE UND DER DEFINITIONEN EINIGER CHROMATOGRAPHISCHER BEGRIFFE

(griechische Buchstaben am Schluß)

ä.D.	äußerer Durchmesser
$b_{0,5}$	Peakbreite in halber Peakhöhe
Beladbarkeit	Definitionen, siehe 4.3.4.6
$\bar{d}_p$	mittlerer Partikeldurchmesser
Detektierbarkeit	Ein Maß für die unter bestimmten chromatographischen Bedingungen kleinste, noch nachweisbare Substanzmenge. Sie ist also abhängig von der Peakbreite, dem Grundlinienrauschen und auch von der relativen Detektorempfindlichkeit der betreffenden Substanz (s.a. Nachweisgrenze).
Empfindlichkeit der Detektion	Sie ist abhängig von der Substanz, d.h. dem Quotienten aus Detektorsignal und Substanzmenge, und vom Grundlinienrauschen des Detektors.
F	Peakfläche
FID	Flammenionisationsdetektor
Fm	Fließmittel
Fronting	Nicht-ideales Elutionsverhalten einer Substanz. Die Hauptmenge der Substanz wird vor dem Peakmaximum eluiert. Die aufsteigende Peakflanke ist weniger steil als die absteigende Peakflanke. Häufiger in der Verteilungschromatographie und nur selten in der Adsorptionschromatographie.
GC	Gaschromatographie
gc	gaschromatographisch
GLC	Gas-Flüssig-Chromatographie (engl.: gas-liquid chromatography)
GSC	Gas-Fest-Chromatographie (engl.: gas-solid chromatography)
Genauigkeit	Streuung der Werte durch unsystematische Fehler, engl.: precision
GPC	Gelpermeationschromatographie
H	Höhe einer theoretischen Trennstufenhöhe, H = L/N
h	Peakhöhe
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (von: high-pressure oder high-performance liquid chromatography)
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (engl.: high-performance thin-layer chromatography)

HSLC	schnelle Flüssigchromatographie (engl.: high-speed liquid chromatography) = HPLC
hR_f	$R_f \cdot 100$
IEC	Ionenaustauschchromatographie (von: ion-exchange chromatography)
i.D.	innerer Durchmesser
isokratisch	bei gleichbleibender Fm-stärke (in der Flüssigchromatographie)
isotherm	bei gleichbleibender Säulentemperatur
K	Permeabilität einer Säulenpackung $K = \frac{u_{lin} \cdot \eta \cdot L}{\Delta p} = \frac{L^2 \cdot \eta}{\Delta p \cdot t_o}$
k'	Verteilungszahl, Kapazitätsfaktor, $k' = (1 - R_f) / R_f = t_s/t_m$
KW	Kohlenwasserstoff
L	Länge einer Säule
LC	Flüssigchromatographie (engl.: liquid chromatography)
LLC	Flüssig-Flüssig-Chromatographie (engl.: liquid-liquid chromatography)
LSC	Flüssig-Fest-Chromatographie (engl.: liquid-solid chromatography)
Lm	Lösemittel
MT	Monoterpen
N	Trennstufenzahl, Zahl der theoretischen Böden; zu ihrer Berechnung wurde in der Regel die Formel $N = 5{,}54 \cdot (t_{m+s}/b_{0,5})^2$ benutzt.
N_{eff}	effektive Trennstufenzahl, Zahl der effektiven theoretischen Böden; $N_{eff} = N \cdot [k'/(1 + k')]^2$
n	Zahl der Meßwerte
N-Kammer	normale Trogkammer; die Dicke des Gasraumes über der DC-Schicht ist $\gg$ 3 mm
Nachweisgrenze	Jene Substanzmenge (in g/ml oder g/sec), die ein Signal von der zweifachen Größe des Detektorrauschens ergibt. Die Konzentration im Peakmaximum errechnet sich nach der Formel[62]: $c_{max} = \frac{G}{V_{m+s}} \cdot \sqrt{\frac{N}{2\pi}}$ (G = Probenmenge)
Δp	Druckabfall in der Säule
PC	Papierchromatographie

PEG	Polyäthylenglykol
PLB	Dünnschichtteilchen (engl.: porous-layer beads)
Porosität	das dem strömenden Fm zur Verfügung stehende Volumen der Säule; der Quotient aus V_m und dem Volumen der leeren Säule.
R_f	Der Quotient aus Wegstrecke des Fleckmittelpunktes und aus der gleichzeitig zurückgelegten Wegstrecke der Fm-Front
R_f'	auf die "wahre" Fm-Front bezogene R_f-Werte; $R_f' = t_m/t_{m+s}$
R_m'	$\log (1-R_f'/R_f') = \log k'$
R_s	Auflösung; $R_s = (t''_{m+s} - t'_{m+s}) / (b''_{0,5} - b'_{0,5})$
RI	Refraktions- oder Brechungsindex
RP	Flüssigchromatographie auf unpolaren stationären Phasen mit polaren Fm
rel. F.	relative Luftfeuchtigkeit
Richtigkeit	Freiheit von systematischen Fehlern (engl.: accuracy)
s	Näherungsstandardabweichung; sie wurde nach der folgenden Gleichung berechnet: $s = \pm\sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$
s_{rel}	relative Standardabweichung (in %), auch Variationskoeffizient genannt; $s_{rel} = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$
SC	Säulenchromatographie
ST	Sesquiterpen
S-Kammer	Sandwich- oder Schmalkammer; die Dicke des Gasraumes über der DC-Schicht ist < 3 mm
t_m	Totzeit, Retentionszeit einer nicht zurückgehaltenen Probe
t_s	Nettoretentionszeit
t_{m+s}	Bruttoretentionszeit
Tailing	Nicht-ideales Elutionsverhalten einer Substanz. Die Konzentration der Probe steigt mit der Elutionszeit rasch an, um nach dem Peakmaximum allmählich abzufallen.
Terpen	Unter diesem Begriff wurden nicht nur die Kohlenwasserstoffe sondern auch die sauerstoffhaltigen und andere Derivate mit entsprechender Anordnung der Kohlenstoffatome verstanden.

u_{lin}	lineare Fließgeschwindigkeit, $u_{lin} = L/t_m$ (cm/sec)
V_m	Totvolumen, Volumen einer nicht zurückgehaltenen Probe
V_s	Nettoretentionsvolumen
V_{m+s}	Bruttoretentionsvolumen
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
α	Selektivitätsfaktor, relative Retention, $\alpha = k_2'/k_1'$
ε°	von Snyder[28] verwendeter Parameter für die Fm-Stärke
ξ	Korrekturfaktor, um aus beobachteten R_f-Werten die "wahren" R_f-Werte zu berechnen; $R_f' = \xi \cdot R_{f(beobachtet)}$

Lebenslauf

Geboren am 25.05.1944 in Schwäbisch-Hall als erstes von drei Kindern. Eltern: Dr. Georg H. Friess, Schriftsteller, und Johanna, geb. Fritzsche, Apotheker.

Grundschule: Herbst 1950 bis Frühjahr 1955 in Stuttgart-Feuerbach und Stuttgart-Zuffenhausen.
Oberschule: Frühjahr 1955 bis zum Jahreswechsel 1959/60 in Stuttgart-Zuffenhausen, danach bis zum Abitur im Frühjahr 1964 am Hebel-Gymnasium in Pforzheim. Anschließend verkürzter Grundwehrdienst von 12 Monaten.
Als Apothekerpraktikant in der Forellen-Apotheke, Pforzheim, vom April 1965 bis zum März 1967. Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin vom Sommersemester 1967 bis zum Staatsexamen im April 1970, Kandidatenjahr zur Erlangung der Approbation als Apotheker vom Mai 1970 bis zum April 1971 in öffentlichen Apotheken. Weitere zwei Jahre Berufsausübung in öffentlichen Apotheken und in einer Krankenhausapotheke.

Seit März 1973 am Pharmazeutischen Institut, Tübingen, zur Erstellung einer Dissertationsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar, welche im Mai 1978 abgeschlossen wurde. In diesem Zeitraum angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft (Oktober 1973 bis Juni 1975), Graduiertenstipendium nach dem Bundesausbildungsförderungs-Gesetz (Juli 1975 bis Januar 1976) und seither als wissenschaftlicher Angestellter am selben Institut tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar waren die Herren Professoren und Dozenten:
H. Auterhoff, E. Graf, J. Schultz, F. Eiden, G. Schenk, H. Möhrle, K.-H. Frömming, H. Loth, K.-H. Beyer (Pharmazie);
E. Reinhard, R. Hänsel (Pharm. Biologie);
H.P.T. Ammon, F.v. Bruchhausen, H.-J. Clemens, O.H. Gauer (Pharmakologie);
K.F. Jahr, G. Manecke (Chemie);
S. Wilking (Physik);
J. Reinert, J. Poelt, B. Angermann, Th. Eckart (Biologie);
B. Schmidt (Hygiene);
E. Bayer und H. Pauschmann (Gaschromatographie).